

Aus der Klinik für Augenheilkunde  
Direktor: Prof. Dr. med. Walter Sekundo  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Pilotstudie zur Messung der Fibrinolytikakonzentrationen der Vorderkammer- und  
Glaskörperflüssigkeit des Auges bei Patienten mit einem Zentralvenen- (ZVV) oder  
Venenastverschluss (VAV)

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von  
Stefan Strodthoff aus Delmenhorst  
Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
10.02.2017.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. S. Mennel

1. Korreferent: Herr Prof. Dr. G. Bein

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
1. Zusammenfassung .....	5
Summary .....	6
2. Einleitung .....	8
2.1. Retinale Venenverschlüsse .....	8
2.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren .....	8
2.1.2. Pathophysiologie mit besonderem Bezug auf die vitreoretinalen Wechselwirkungen .....	8
2.1.3. Klassifikation der retinalen Gefäßverschlüsse .....	10
2.1.4. Diagnostik .....	11
2.1.5. Behandlungsstrategien bei retinalen Gefäßverschlüssen .....	11
2.2. Einführung in das fibrinolytische System .....	14
2.3. Konzept der enzymatischen Vitreolyse .....	15
2.4. Zielsetzung der Arbeit .....	15
3. Material und Methoden .....	17
3.1. Studiendesign „Studie 2010“ .....	17
3.1.1. Patientenrekrutierung „Studie 2010“ .....	17
3.1.2. Klinische Untersuchungsmethoden „Studie 2010“ .....	18
3.1.3. Probenentnahme „Studie 2010“ .....	24
3.1.4. Laboranalysen „Studie 2010“ .....	25
3.2. Studiendesign „Studie 2012“ .....	26
3.2.1. Patientenrekrutierung „Studie 2012“ .....	27
3.2.2. Klinische Untersuchungsmethoden „Studie 2012“ .....	28

3.2.3.	Probenentnahme „Studie 2012“ .....	29
3.2.4.	Laboranalysen „Studie 2012“ .....	31
3.3.	Statistische Auswertung .....	31
4.	Ergebnisse.....	33
4.1.	Ergebnisse der „Studie 2010“ .....	33
4.1.1.	Untersuchung der Kammerwasserproben .....	36
4.1.2.	Untersuchung der Glaskörperproben .....	39
4.2.	Ergebnisse der „Studie 2012“ .....	42
5.	Diskussion .....	52
5.1.	Methodenkritik .....	52
5.1.1.	Studie 2010 .....	52
5.1.2.	Studie 2012 .....	53
5.2.	Ergebnisse .....	54
5.3.	Klinische Relevanz .....	55
	Literaturverzeichnis .....	57
	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	66
	Tabellenverzeichnis .....	66
	Abbildungsverzeichnis .....	67
	Abkürzungsverzeichnis .....	69
	Anhang: Daten der Studienpatienten „Studie 2012“ .....	71
	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	75
	Danksagung .....	78

## 1. Zusammenfassung

Retinale Venenverschlüsse sind häufige Ursachen für Visusminderung und Erblindung, die Prävalenz des Zentralvenenverschlusses (ZVV) beträgt 80/100.000 Einwohner und des Venenastverschlusses (VAV) 442/100.000 Einwohner (Rogers et al. 2010, McIntosh et al. 2010). Hämorrhagien, Ischämien und die Entwicklung eines zystoiden Makulaödems (ZMÖ) als Folge eines retinalen Venenverschlusses können zu einer schweren und chronischen Visusminderung führen (McAllister 2012). Studien zeigten einen deutlichen Einfluss des Glaskörpers auf die Pathophysiologie und Prognose der retinalen Venenverschlüsse. Ein anliegender Glaskörper gilt als Risikofaktor für die Entstehung einer retinalen Venenthrombose, für Neovaskularisationen und fördert die Chronifizierung des ZMÖ (Scholl et al. 2010, Bertelmann et al. 2011), sodass Verfahren zur Vitreolyse im Fokus aktueller Forschung stehen. Neben der Vitrektomie als operative Möglichkeit den Glaskörper zu entfernen, ergibt sich ein Ansatz zur medikamentösen Vitreolyse mittels Gewebsplasminogen Aktivator (rt-PA) (Murakami et al. 2006). In der vorliegenden Studie sollen die Faktoren der Fibrinolyse, als Voraussetzung zur Wirkung des rt-PA nachgewiesen werden.

Es wurden 47 Augen in drei Studiengruppen untersucht. 14 Augen mit ZVV, 22 mit VAV und elf in der Kontrollgruppe. Es wurde mittels core pars plana Vitrektomie Glaskörperflüssigkeit entnommen und anschließend eingefroren. Zur Untersuchung wurde die Glaskörperflüssigkeit mit einem neuartigen Verfahren stabilisiert und auf Plasminogen, VEGF, Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin (PAP) und D-Dimere mittels ELISA Verfahren getestet.

Die intravitrealen Aktivitäten und Konzentrationen lagen in den Studiengruppen ZVV-, VAV- und Kontrollgruppe bei  $2,07 \pm 1,87\%N$ / $1,24 \pm 1,12\%N$ / $0,38 \pm 0,63\%N$  für Plasminogen,  $1268,71 \pm 1318,46\text{pg/ml}$ / $527,77 \pm 543,28\text{pg/ml}$ / $104,91 \pm 115,92\text{pg/ml}$  für VEGF,  $8,14 \pm 7,07\text{ng/ml}$ / $6,96 \pm 4,8\text{ng/ml}$ / $9,74 \pm 10,98\text{ng/ml}$  für PAP und  $60,94 \pm 150,4\text{ng/ml}$ / $68,83 \pm 94,75\text{ng/ml}$ / $9,34 \pm 14,48\text{ng/ml}$  für D-Dimere. Bei Plasminogen ( $p < 0,001$ ) und VEGF ( $p = 0,001$ ) gab es signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Dabei korrelierte die Konzentration des funktionellen Plasminogen

signifikant mit der Konzentration des VEGF-A ( $r = 0,476$ ,  $p = 0,001$ ) als Zeichen der Schwere der Blut-Retina-Schranken (BRS) Störung.

Erstmals gelang mit dieser innovativen Methode der intraokuläre Plasminogennachweis bei Patienten mit ZVV und VAV (Bertelmann et al. 2015). Die Aktivität korreliert mit der Schwere der BRS Störung (Noma et al. 2008). Die weiteren Faktoren der Fibrinolyse und die klinische Wirksamkeit des rt-PA sollten in weiteren Studien untersucht werden.

## Summary

Retinal vein occlusions (RVO) are common reasons for visual loss and blindness. The prevalence is about 80 per 100.000 for central retinal vein occlusion (CRVA) and 442 per 100.000 for branch retinal vein occlusion (BRVO) (Rogers et al. 2010, MacIntosh et al. 2010). In consequence of RVO the development of hemorrhages, ischaemia and cystoid macula edema (CME) may substantially decrease visual acuity (McAllister 2012). There is an obvious impact of vitreous adhesion status and pathophysiology and prognosis of RVO. An attached posterior vitreous cortex is a risk factor for the development of CRVO and BRVO, for neovascularisation as well as for chronic CME (Scholl et al. 2010; Bertelmann et al. 2011). The induction of a posterior vitreous detachment is in focus of current studies. Besides pars plana vitrectomy, enzymatic vitreolysis with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA) might be an option (Murakami et al. 2006). The purpose of this study is the detection of components of the fibrinolytic cascade, which are precondition for the effect of rt-PA.

47 eyes were enrolled in this survey, comprising 14 eyes with CRVO, 22 with BRVO and 11 in the control group. Fluid from the vitreous was obtained by core pars plana vitrectomy and was frozen immediately. For the purpose of this investigation we stabilized these samples with an innovative method for determining plasminogen, VEGF, plasmin- $\alpha$ 2-antiplasmin-complex (PAP) and D-dimer activities and/or concentrations.

Intravitreal activities and concentrations in the CRVO/BRVO/control group were  $2,07 \pm 1,87\%N/1,24 \pm 1,12\%N/0,38 \pm 0,63\%N$  for plasminogen,  $1268,71 \pm 1318,46pg/ml/527,77 \pm 543,28pg/ml/104,91 \pm 115,92pg/ml$  for VEGF,

8,14±7,07ng/ml/6,96±4,8ng/ml/9,74±10,98ng/ml for PAP and 60,94±150,4ng/ml/68,83±94,75ng/ml/9,34±14,48ng/ml for D-dimer. Significant differences of intravitreal plasminogen ( $p<0,001$ ) and VEGF ( $p=0,001$ ) between the groups were analysed. Intravitreal plasminogen correlated with intravitreal VEGF ( $r = 0,476$ ,  $p = 0,001$ ), the latter being a biomarker for blood-retina barrier (BRB) breakdown.

Intraocular plasminogen activity was detected for the first time with an innovative analysis method at patients with CRVO or BRVO (Bertelmann et al. 2015). The activity correlates positively with the severity of BRB breakdown (Noma et al. 2008). More components of the fibrinolytic cascade and the efficacy of rt-PA treatment for posterior vitreous detachment (PVD) induction should be explored in further investigations.

## **2. Einleitung**

### **2.1. Retinale Venenverschlüsse**

#### **2.1.1. Epidemiologie und Risikofaktoren**

Venöse Verschlusskrankheiten des Auges sind seit 1878 bekannt (Michel 1878). Rein deskriptiv wurden sie bereits 30 Jahre eher erwähnt (Liebreich 1855). Heute sind sie wichtige und häufige Ursachen für einseitige Erblindungen, vor allem im höheren Erwachsenenalter. In dieser Patientengruppe sind der Zentralvenenverschluss (ZVV) und der Venenastverschluss (VAV) nach der diabetischen Retinopathie die häufigsten Ursachen für eine gefäßbedingte Sehschwäche (McAllister 2012). Weltweit sind wahrscheinlich ca. 16 Millionen Menschen erkrankt. Die Prävalenz des ZVV beträgt 80/100.000 Einwohner und 442/100.000 Einwohner für den VAV (Rogers et al. 2010).

Es sind vielfältige systemische und lokale Risikofaktoren für VAV und ZVV bekannt. Die systemischen Risikofaktoren korrelieren häufig mit dem sogenannten metabolischen Syndrom. Bekannt sind Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Atherosklerose (und assoziierte Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit), erhöhtes Gewicht und Nikotinabusus. Okuläre Risikofaktoren sind das Glaukom, eine verminderte okuläre Perfusion, orbitale Neoplasien, eine externe Druckeinwirkung auf den Bulbus, die endokrine Orbitopathie und retinale arteriovenöse Kreuzungen (Kolar et al. 2014).

#### **2.1.2. Pathophysiologie mit besonderem Bezug auf die vitreoretinalen Wechselwirkungen**

Die Pathogenese der retinalen Gefäßverschlüsse scheint nicht abschließend geklärt. Zentralvenenverschlüsse scheinen durch Thromben in Höhe der Lamina cribrosa zu entstehen (Green et al. 1981), die Verschlüsse der Venenäste durch Kompression der Venen durch veränderte Arterien im arteriovenösen Kreuzungsbereich (Duker et al. 1989). Folgen sind intraretinale Hämorrhagien, makuläre Ischämien und die Entwicklung eines zystoiden Makulaödems (ZMÖ) mit konsekutiver Visusreduktion. (Hikichi/Konno et al. 1995, Takahashi et al. 1997, Scholl et al. 2010). Dabei bestimmt das Ausmaß der Ischämie das Ausmaß des Makulaödems (Singer et al. 2014).



Häufige Komplikationen sind die Entstehung von präretinalen Gefäßneubildungen und einer Rubeosis iridis (mit der Gefahr eines rubeotischen Sekundärglaukoms). Diese Neovaskularisationen spielen, neben der Ausprägung des Makulaödems, eine große Rolle bei der Visusprognose, sodass die Zusammenhänge von Ischämie, Glaskörperadhäsionsstatus und Neovaskularisation in den Fokus der Forschung gerückt sind (Hikichi/Konno et al. 1995). Dabei zeigen Augen mit VAV oder ZVV deutlich häufiger einen anliegenden Glaskörper (Bertelmann et al. 2011), es scheint sogar, dass ein anliegender Glaskörper ein unabhängiger Risikofaktor zur Entstehung ist (Bertelmann et al. 2014). Ferner scheint ein anliegender Glaskörper die Chronifizierung des ZMÖ und die Ausbildung von Neovaskularisationen zu fördern und ist damit prognostisch hoch relevant (Scholl et al. 2010). Er scheint unter anderem tangentialen Zug auf die Retina auszuüben und dadurch pathophysiologische Vorgänge zu verstärken (Krebs et al. 2007).

Der Glaskörper haftet physiologischerweise mit seiner hinteren Glaskörpergrenzschicht der innersten Netzhautschicht (Lamina limitans interna (ILM)) an. Die Verbindung zwischen der hinteren Glaskörpergrenzschicht und der ILM wird über mehrere Konnektionsproteine bedingt. In verschiedenem Maße spielen Laminin und Fibronektin eine Rolle. Die Adhäsion ist im Bereich der Ora serrata des Glaskörpers, am Sehnervkopf und an der Fovea centralis besonders stark (Kohno et al. 1987). Eine Lösung der hinteren Glaskörpergrenzschicht von der ILM kann im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses erfolgen. Dabei gibt es Risikofaktoren wie Alter, weibliches Geschlecht (Shen et al. 2013), Myopie (Morita et al. 1995) erhöhte Vitamin B6 Aufnahme, Menopause (Chuo et al. 2006), und Retinitis pigmentosa (Hikichi/Akiba et al. 1995). In den meisten Fällen treten bei der hinteren Glaskörperabhebung keine Probleme auf, daher werden diese kaum wahrgenommen. Ist sie symptomatisch, geht sie jedoch in ca. 24 % der Fälle mit Komplikationen, wie retinaler Traktion, Amotio retinae, Makulaforamina, Glaskörper- oder Retinablutungen einher (Shen et al. 2013).

Im Rahmen des zentralen Makulaödems kommt es zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke, sodass die Konzentration der Fibrinolytika im Glaskörper bzw. in der

Vorderkammerflüssigkeit einen Hinweis auf die Schwere der Schrankenstörung geben könnte. Dieser Zusammenhang ist sowohl im Kammerwasser als auch im Glaskörper für die VEGF und Interleukin-6 (IL-6) bereits nachgewiesen. Eine Korrelation zwischen der Konzentration der Zytokine im Kammerwasser und der Konzentration der Zytokine im Glaskörper konnte von einer Arbeitsgruppe aufgezeigt werden (Noma et al. 2008, Noma et al. 2010), in anderen Studien gelang diese Korrelation nicht (Ecker et al. 2011).

### 2.1.3. Klassifikation der retinalen Gefäßverschlüsse

Meistens wird der retinale Gefäßverschluss nach Ausdehnung eingeteilt. Dabei werden

- Zentralvenenverschluss (ZVV)
- Hemizentralvenenverschluss (Hemi-ZVV) und
- Venenastverschluss (VAV)

unterschieden. Der Hemizentralvenenverschluss wird oft der Gruppe der Zentralvenenverschlüsse zugeordnet (auch in dieser Studie). Der ZVV und VAV werden in *ischämisch* und *nichtischämisch* unterteilt. Sofern diese Einteilung aufgrund retinaler Blutungen noch nicht möglich ist, wird der Venenverschluss bis zur ausreichenden Beurteilung als hämorrhagisch klassifiziert. Venenastverschlüsse können in einer Hauptvene, in einem Makulaast (*makulärer VAV*) oder peripher entstehen (*peripherer VAV*) (Rehak et al. 2010). In dieser Studie gilt das fluoreszenzangiographische Ausmaß der Ischämie als Hauptkriterium zur Klassifikation der Ischämie. Bei ZVV gilt eine fluoreszenzangiographische Ischämie von  $\geq 10$  PD (Papillendurchmesser) als Kriterium (Zegarra et al. 1979), bei VAV von  $\geq 5$  PD (Branch Vein Occlusion Study Group 1986).

Zentralvenenverschluss	Venenastverschluss
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nichtischämischer ZVV</li> <li>- Ischämischer ZVV</li> <li>- Nichtischämischer Hemi-ZVV</li> <li>- Ischämischer Hemi-ZVV</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nichtischämischer VAV</li> <li>- Ischämischer VAV</li> </ul>

**Tabelle 2.1: Klassifikation der retinalen Gefäßverschlüsse**

Die Entwicklung einer ischämischen Form aus einer nichtischämischen wird in ca. 30 % beobachtet (Hayreh et al. 1994).

#### **2.1.4. Diagnostik**

Die Basisdiagnostik umfasst die Bestimmung des Visus, des intraokularen Druckes, einer Ophthalmoskopie, sowie einer internistischen Abklärung und Diagnostik. Zur weiteren Differenzierung des Grades der Ischämie wird eine Fluoreszenzangiographie durchgeführt. Eine Elektroretinographie und die Untersuchung eines möglichen relativen afferenten Pupillendefizits können weitere wertvolle Hinweise auf eine Ischämie ergeben. Eine Goldmann-Perimetrie bestimmt sensitiv und spezifisch Gesichtsfeldausfälle (Hayreh 2003). Das Ausmaß des zystoiden Makulaödems und die Zentrale Netzhautdicke werden durch ein SD-OCT festgestellt (Hoerauf et al. 2010).

#### **2.1.5. Behandlungsstrategien bei retinalen Gefäßverschlüssen**

Bei neu aufgetretenem retinalen Gefäßverschluss galt lange eine Antikoagulation oder Thrombozytenaggregationshemmung als sinnvoll. In mehreren Studien wurden Warfarin, Acetylsalicylsäure und niedermolekulare Heparine bewertet, dabei zeichnete sich keine klare Empfehlung ab. Eventuell haben niedermolekulare Heparine eine Indikation (Squizzato et al. 2010), jedoch sieht sie die derzeitige Stellungnahme der wissenschaftlichen Gesellschaften zur Therapie des Makulaödems bei retinalen Venenverschluss derzeit nicht vor (Hoerauf et al. 2010).

Ein weiterer Ansatz ist die Herabsetzung der Viskosität des Blutes um bessere rheologische Eigenschaften zu erzielen. Das Konzept dabei sieht eine Verbesserung der poststenotischen Durchblutung vor und es scheint diskrete, aber signifikante, Verbesserungen des Visusverlaufes nach einer rheologischen Behandlung zu geben. Das erfolgreichste Verfahren scheint die isovolämische Hämodilution zu sein. Dabei wird ein Aderlass begonnen und simultan ein Plasmaexpander infundiert. Es wird eine Senkung des Hämatokrits um 0,05 – 0,1 angestrebt (Glacet-Bernard et al. 2001; Hoerauf et al. 2010).

Bei ausgeprägtem Makulaödem und bei ischämischen Verlaufsformen wird eine zentrale, gitterförmige Laserkoagulation durchgeführt (GRID-Laserkoagulation). Dabei nimmt das sichtbare Leck in der FAG ab, aber eine Verbesserung des Visus konnte nur für den VAV signifikant nachgewiesen werden. Für die Anwendung beim ZVV gab es in den letzten Studien keine Evidenz (Hoerauf et al. 2010, Yeh 2015).

Eine Vitrektomie zur chirurgischen Abhebung des Glaskörpers von der Netzhaut hat seit vielen Jahren, in gewissen Fällen, ihren Stellenwert in der Therapie retinaler Gefäßverschlüsse. So zeigte sich bereits vor fast 20 Jahren, dass gerade Patienten mit RVO und ZMÖ von einer Vitrektomie profitieren (Tachi et al. 1999). Insbesondere der Visusverlauf ist sehr günstig. Er steigt signifikant und ein vorhandenes zystoides Makulaödem scheint abzunehmen (Murakami et al. 2007). Die Standardoperation dazu ist die *pars plana Vitrektomie* (ppV). Diese Operation hat erhebliche Komplikationsrisiken wie Kataraktbildung, Netzhautablösungen, Blutungen oder Infektionen (Lang et al. 2008). Da die ppV meist in Allgemeinnarkose durchgeführt wird, müssen anästhesiologische Risiken ebenfalls bedacht werden (McChannel et al. 2003).

Als Ergänzung zur Vitrektomie galt die Sheathotomie als Therapie des ZMÖ bei VAV. Bei dieser 1988 erstmals beschriebenen Operation wird die Adventitia der sich überkreuzenden retinalen Vene und Arterie gespalten (Osterloh et al. 1988). Auch dabei wurde eine Verbesserung des Visus und des ZMÖ beschrieben, ein signifikanter Vorteil gegenüber der einfachen ppV zeigt sich jedoch nicht (Yamamoto et al. 2004).

Für die medikamentöse Therapie der retinalen Gefäßverschlüsse gibt es verschiedene Möglichkeiten. Derzeit wird vor allem die topische, intravitreale Applikation gewählt. Dabei werden Kortikosteroide und/oder Anti-VEGF (vascular endothelial growth factor) Präparate appliziert. Vereinzelt werden auch rt-PA (recombinant tissue-type plasminogen activator)-Präparate genutzt, jedoch eher im Rahmen von Studien.

Kortikosteroide hemmen die inflammatorische Antwort und damit die Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren. Die Blut-Retina-Schranke wird so stabilisiert (Hoerauf et al. 2010). Für die Therapie mit Kortikosteroiden stehen verschiedene Präparate zur Verfügung. Dabei wird Dexamethason oder Triamcinolon (letztes „off-Label“) intravitreal verabreicht. Dexamethason ist auch als Implantat (Ozurdex®), welches intravitreal positioniert über sechs Monate seinen Wirkstoff freisetzt, verfügbar. Die Ergebnisse zeigen eine Verbesserung der Sehschärfe und eine Abnahme der zentralen Netzhautdicke, aber es wird auch von unerwünschten

Arzneimittelwirkungen, wie Katarakt und erhöhtem intraokulären Druck berichtet (Ip et al. 2009, Haller et al. 2010, Haller et al. 2011).

VEGF ist ein Signalprotein, welches eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielt. Erhöhte VEGF Konzentrationen werden durch eine Hypoxie und Ischämie, sowie inflammatorische Prozesse der Retina verursacht (Håkansson et al. 2010) und können zu Makulaödemen (Scholl 2010), zu Neovaskularisationen (Murdoch et al. 1991; Aiello et al. 1994) und dadurch ggf. zu Ablationes retinae, Glaskörperblutungen und Glaukomerkrankungen führen (Aiello et al. 1994). Seit 2005 wird die intravitreale Anwendung von Anti-VEGF (monoklonale Antikörper vom IgG-Typ) beschrieben und erforscht (Rosenfeld et al. 2005). Durch die Anti-VEGF Therapie kann die Entstehung dieser Komplikationen verzögert werden (Ryu et al. 2014). Es zeigt sich eine rasche Regression des ZMÖ und eine Verbesserung der Sehschärfe (Brown et al. 2010; Thach et al. 2014). Anfangs gilt es monatliche Kontrollen durchzuführen und eine erneute Applikation zu reevaluieren, da es schon früh zum Rezidiv kommen kann (Hoerauf et al. 2010; Yeh et al. 2015).

Es sind hauptsächlich vier Anti-VEGF-Präparate zur Behandlung eines Makulaödems getestet worden (Yeh et al. 2015):

- Pegaptanib (Macugen®)
- Ranibizumab (Lucentis®)
- Bevacizumab (Avastin®)
- Aflibercept (Eylea®)

Teilweise liegt keine Zulassung zur Behandlung eines zystoiden Makulaödems bei retinalem Gefäßverschluss vor, sodass einzelne Substanzen „off-Label“ eingesetzt werden.

Derzeit sind Ranibizumab und Aflibercept zur Behandlung des ZMÖ bei ZVV und VAV zugelassen. Pegaptanib ist lediglich für die Behandlung der feuchten altersabhängigen Makuladegeneration zugelassen und Bevacizumab hat keine Zulassung zur intravitrealen Anwendung (vgl. Fachinformationen der angegebenen Präparate, Stand Februar 2015).

## 2.2. Einführung in das fibrinolytische System

Um einen kontinuierlichen Blutfluss zu gewährleisten, besteht ein stetiges Wechselspiel zwischen Gerinnungsvorgängen und dem fibrinolytischen Abbau der Fibrinablagerung (Pape et al. 2014). Fibrin wird durch die Endopeptidase Plasmin gespalten, welche aus Plasminogen gebildet wird. Das inaktive Plasminogen wird in der Leber gebildet und die Aktivierung zu Plasmin wird durch Aktivatoren und Inhibitoren reguliert (Pape et al. 2014). Aktivatoren sind die Gerinnungsfaktoren XIa, XIIa, das Kallikrein, der Gewebsplasminogen Aktivator (tPA) sowie die Urokinase. tPA und Urokinase werden durch den *plasminogen activator inhibitor (PAI) 1 und 2* inhibiert. Das  $\alpha$ 2-Antiplasmin inhibiert bereits aktiviertes Plasmin unter Bildung eines Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin Komplexes (PAP (Pape et al. 2014).

Neben den hier beschriebenen Inhibitoren gibt es noch weitere Faktoren (zum Beispiel  $\alpha$ 1-Protease-Inhibitor, Antithrombin und  $\alpha$ 2-Macroglobulin), welche in unserer Studie nicht untersucht werden und in der folgenden Schemazeichnung keine Erwähnung finden (Vgl. Dörner 2013, Pape et al. 2014, Renz et al. 2009).

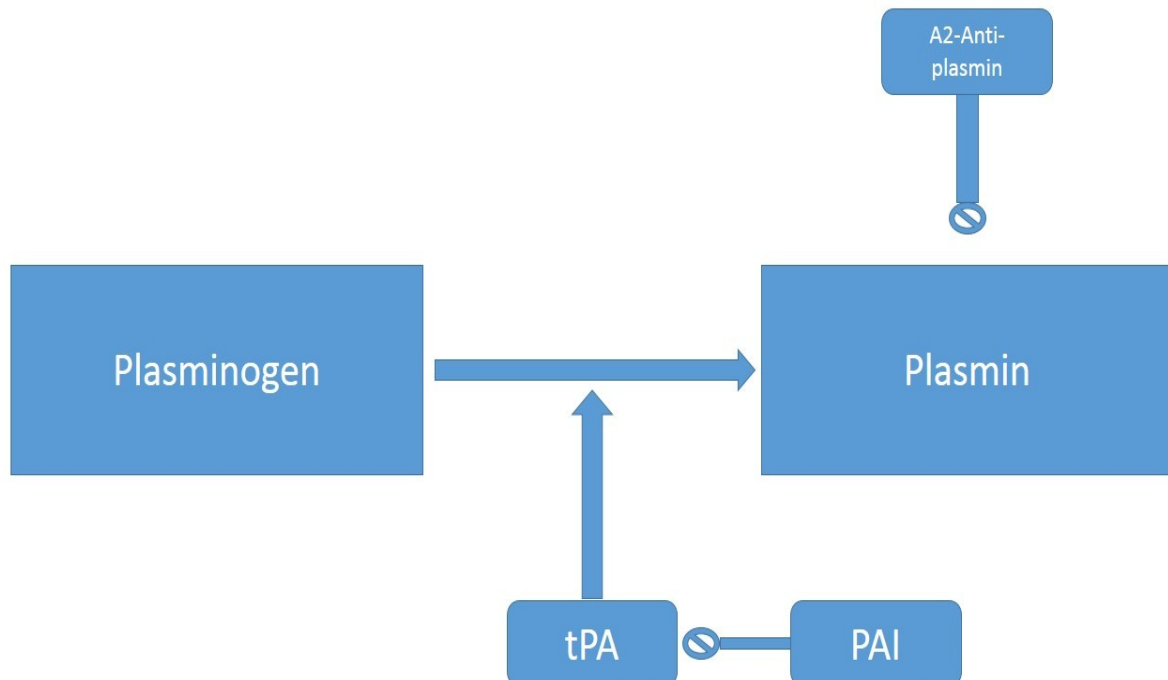


Abbildung 2.1: Darstellung der Regulation der Fibrinolyse. Pfeile stellen eine Aktivierung dar, die durchgestrichenen Kreise eine Inhibition. Es wurden nur die untersuchten Faktoren dargestellt (Vgl. Dörner 2013)

### **2.3. Konzept der enzymatischen Vitreolyse**

Es gibt verschiedene Ansätze, durch intravitreale Injektionen eine hintere Glaskörperabhebung herbei zu führen. Dabei gab es bisher sowohl Ansätze im Tiermodell mit t-PA und Kryopexie (Hesse 2000), mit Hyaluronidase (Hikichi 2000), als auch mit Plasmin und Schwefelhexafluorid (Hikichi 1999). Im Rahmen von Studien an ausgewählten Patientenkollektiven wurde vor allem Gewebsplasminogen Aktivator (t-PA) (Murakami 2006, Murakami 2007) als auch Microplasmin (De Smet 2009, Stalmans 2010) und Ocriplasmin (Stalmans 2012, Haller 2015) erprobt.

Eine intravitreale Medikamentenapplikation bietet einige Vorteile gegenüber einer operativen Vitrektomie. So ist bei der Injektion lediglich eine topische Anästhesie notwendig. Es werden die Risiken einer Allgemeinanästhesie vermieden und die Operationsdauer ist deutlich geringer. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass nach einer Vitrektomie eventuell verbliebene Glaskörperreste einen tangentialen Zug auslösen und damit die klinische Situation verschlechtern können (Vander 1992, Le Mer 1994). Eine effektive medikamentöse Vitreolyse könnte damit in Zukunft in vielen Fällen eine bessere Alternative zur pars-plana-Vitrektomie darstellen. Die medikamentenunabhängige Induktion einer hinteren Glaskörperabhebung durch die Injektion intravitrealer Medikamente muss ebenfalls aufgrund aktueller Studienergebnisse berücksichtigt werden (Geck et al. 2013).

### **2.4. Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Bestimmung der Konzentrationen der Komponenten des fibrinolytischen Systems im Glaskörper bei Patienten mit retinalen Venenverschlüssen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die Therapie von Zentralvenen- und Venenastverschluss sind vor allem aufgrund ihrer Häufigkeit und deutlichen Minderung der Sehschärfe hoch relevant. Die Entwicklung der Fragestellung geschah vor dem Hintergrund, dass die enzymatische Vitreolyse mit rt-PA ein vielversprechendes Verfahren in der Behandlung von Patienten mit retinalen Venenverschlüssen sein kann, die pathophysiologischen Grundlagen bisher jedoch weitgehend ungeklärt waren. rt-PA kann nur dann wirken, wenn es Plasminogen zu

Plasmin spalten und damit aktivieren kann (Hesse 2000). Ein Plasminogennachweis bei Patienten mit RVO ist eine wichtige Grundlage dieser Therapie.



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Studiendesign „Studie 2010“**

Die „Pilotstudie zur Messung der Fibrinolytikakonzentrationen des Blutplasmas und der Vorderkammer- und Glaskörperflüssigkeit des Auges bei Patienten mit einem Zentralvenen- (ZVV) oder Venenastverschluss“ war eine Querschnittsstudie, die monozentrisch an der Universitätsaugenklinik Marburg durchgeführt wurde. Der Erhebungszeitraum erstreckte sich von Februar 2009 bis September 2011. Die Studie wurde bei der Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg (Vorsitzender: Prof. Dr. med. Gerd Richter) beantragt und erhielt vor Studienbeginn ein positives Votum. Die Studiennummer der Ethikkommission lautet: 117/10. Bei der Durchführung der Studie wurden die Leitsätze der European Guidelines for Good Clinical Practice (GCP) sowie der Deklaration von Helsinki von 1975 (sechste Revision von 2008) berücksichtigt und eingehalten. Es handelte sich um einen Wissensversuch und es gab keinen Auftraggeber der Studie.

##### **3.1.1. Patientenrekrutierung „Studie 2010“**

Für die Studie wurden Patienten um ihre Teilnahme gebeten, bei denen eine ambulante oder stationäre Kataraktoperation und/oder eine Vitrektomie (ppV) geplant waren. Die Patienten wurden, nach der Operationsaufklärung durch den zuständigen Arzt, über die Studie informiert und mit standardisierten Aufklärungsbögen über Ziel, Methoden und Risiken der Studie informiert.

Die Studienpatienten mussten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Der Patient war zwischen 18 und 85 Jahre alt.
- Er war im Vollbesitz seiner geistigen Kräfte.
- Es wurde eine Kataraktoperation und/oder Vitrektomie vorgenommen.
- Es lagen keine Ausschlusskriterien vor.

Die Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme waren:

- Der Patient hatte eine geistige Erkrankung (war also nicht einwilligungsfähig)
- Schwangere Patientinnen

- Es waren Neoplasien bekannt.
- Autoimmunologische Erkrankung (auch Diabetes mellitus Typ I)
- Diabetes mellitus Typ II
- Patienten mit exsudativer AMD
- Glaukompatienten
- Patienten mit akuten Infektionen
- Schwere Leber- und Lungenfunktionsstörungen
- Suchterkrankungen

Neben der Anamnese bei der Studienpatientenrekrutierung wurden auch die vorliegenden Befunde und Arztbriefe aus der Krankenakte berücksichtigt.

### **3.1.2. Klinische Untersuchungsmethoden „Studie 2010“**

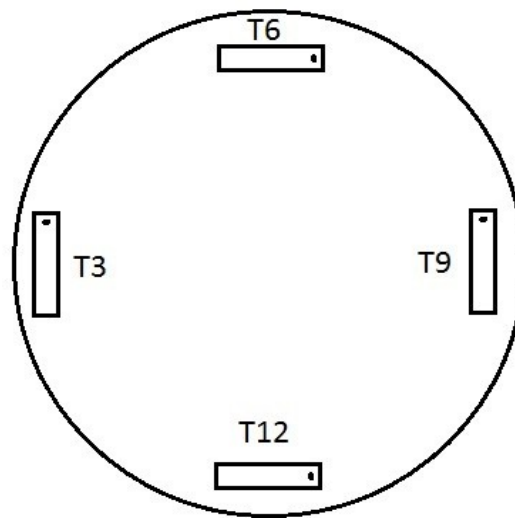
Die klinische Untersuchung erfolgte vor der Probengewinnung. Ein Hauptziel der Untersuchungen war die Feststellung des Glaskörperstatus. Bei Studienteilnehmern, bei denen eine Kataraktoperation erfolgte, war das im Anschluss an die Voruntersuchung im Ambulatorium der Augenklinik (in der Regel zwei bis vier Wochen vor dem Operationstermin). Die pars plana-Vitrektomie (ppV) wurde stets während eines stationären Aufenthaltes durchgeführt. Hier wurden die Untersuchungen am Vortag der Operation erhoben. Nach Abschluss der Erhebung befundete ein Assistenzarzt der Klinik die ausgedruckten Schnittechogramme und die OCT Bilder ohne Kenntnis des Funduskopiebefundes oder des intraoperativ festgestellten Glaskörperstatus. Nach Beurteilung aller Untersuchungen legte sich der Untersucher auf einen Glaskörperstatus fest: *Glaskörper der Netzhaut anliegend, Glaskörper partiell abgehoben, Glaskörper komplett abgehoben* oder *Glaskörperstatus nicht beurteilbar*.

#### **3.1.2.1. B-Scan Ultraschall**

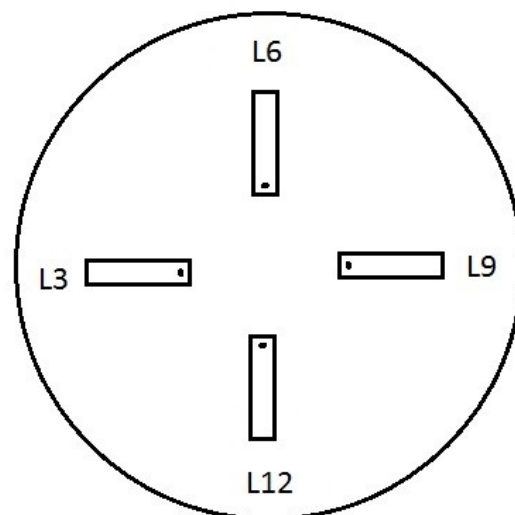
Die Frequenz der Ultraschallwellen betrug 10 MHz. Ziel war die Darstellung der hinteren Glaskörpergrenzschicht, um eine hintere Glaskörperabhebung nachzuweisen.

Das physikalische Prinzip der Ultraschalluntersuchung besteht in der Emission eines Schallimpulses und der Messung der Reflexionen an akustischen Grenzflächen (Echos). Das gemessene lineare Echo wird in Helligkeitswerte umgesetzt und ergibt zusammen

mit der zeitlichen Verzögerung das Ultraschallschnittbild (B-Scan, B=Brightness). Ultraschall ist eine etablierte Methode der klinischen Diagnostik in der Augenheilkunde und wird für vielfältige Indikationen eingesetzt (Kroll et al. 2008). Die Ultraschalluntersuchung erfolgte in unserer Studie am liegenden Patienten. Es wurden am Studienauge acht Schnittbilder im B-Scan Modus durchgeführt: Die Meridiane 3, 6, 9 und 12 jeweils in transversaler und longitudinaler Schallkopforientierung (analog der MIVI-Studie (Stalsmans 2012)).



**Abbildung 3.1: Schallkopforientierung der transversalen Schnittbilder**



**Abbildung 3.2: Schallkopforientierung der longitudinalen Schnittbilder**

Die Schnittbilder wurden mit Patientennamen, Schallkopforientierung und Meridian, sowie OD, bzw. OS beschriftet und ausgedruckt und zusammen mit dem Case-Report-Form (CRF), dem OCT Ausdruck und den Laborergebnissen archiviert.

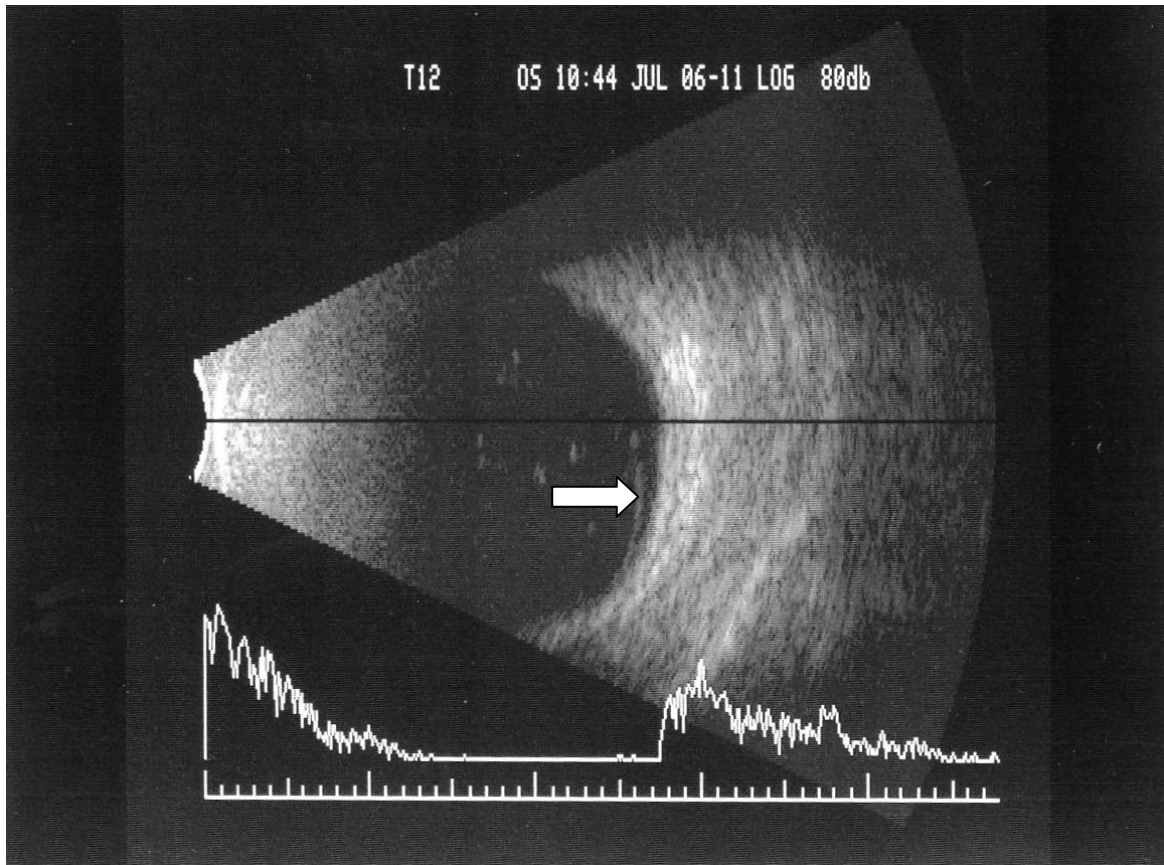


Abbildung 3.3: Sonographie des linken Bulbus in transversaler Schallkopforientierung. Der partiell abgehobene Glaskörper ist durch die Markierung dargestellt (weißer Pfeil).

### 3.1.2.2. *Optische Kohärenztomographie (OCT)*

Für die Studien verwendeten wir ein OCT Gerät der Firma Optovue OCT analysis (Carlsbad, CA, USA). Die optische Kohärenztomographie ist ein nicht invasives Schnittbildverfahren mit punktueller Abtastung des Zielobjektes mittels Licht mit kurzwelliger Kohärenz. Das Verfahren ähnelt dem der Ultraschalldiagnostik, allerdings wird hierbei anstatt des Schalls Licht verwendet. Das Licht wird nach der Emission durch die verschiedenen Strukturen der Retina unterschiedlich reflektiert. Die reflektierten Lichtstrahlen werden durch einen Interferometer zusammen geführt und es entsteht eine Interferenz. Diese wird durch einen Fotodetektor gemessen und nach den Laufzeiten zu einem Bild zusammengesetzt (Kroll et al. 2008). Dabei wird ähnlich des B-Scan-Bildes der Sonographie ein 2D Bild erstellt. Bei guter axialer Auflösung

besteht die Möglichkeit eine Auflösung von 3-6  $\mu\text{m}$  zu erreichen. Das Studienprogramm umfasste die Programme Crossline- und EMM-5. Das Crossline-Programm zeigt einen Querschnitt der Neuroretina. Diese Darstellung nutzten wir zum Aufzeigen der hinteren Glaskörpergrenzschicht (PVC). EMM-5 steht für *Enhanced Macula Map 5* und erstellt eine Höhenkarte der Retinaoberfläche (Einheit  $\mu\text{m}$ ).

Die Bilder wurden anschließend auf Darstellung des PVC zum Nachweis einer hinteren Glaskörperabhebung (PVD) von der ILM befundet. Weiter wurde im EMM-5 Programm die zentrale Makuladicke (CMT) gemessen.

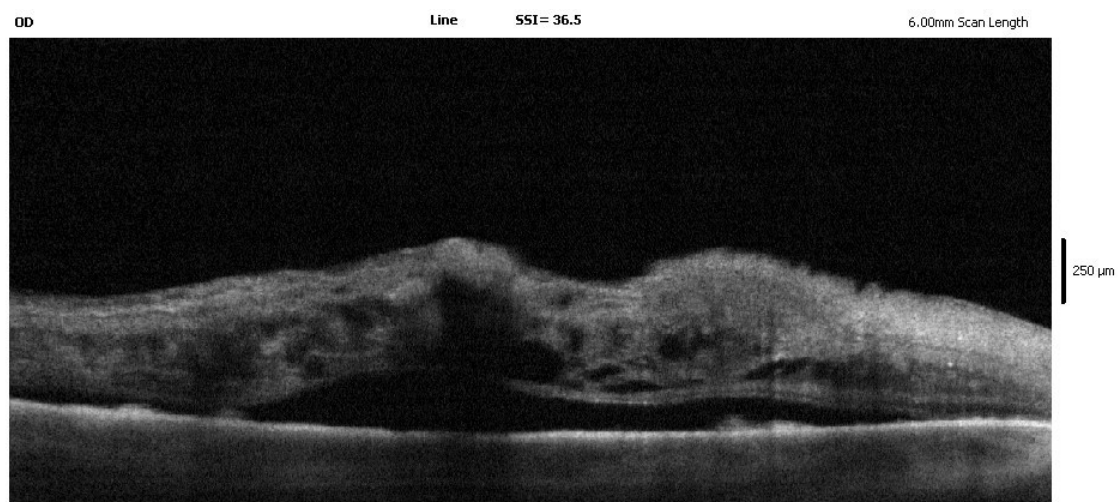


Abbildung 3.4: OCT (Programm Crossline) mit Darstellung eines zystoiden Makulaödems.

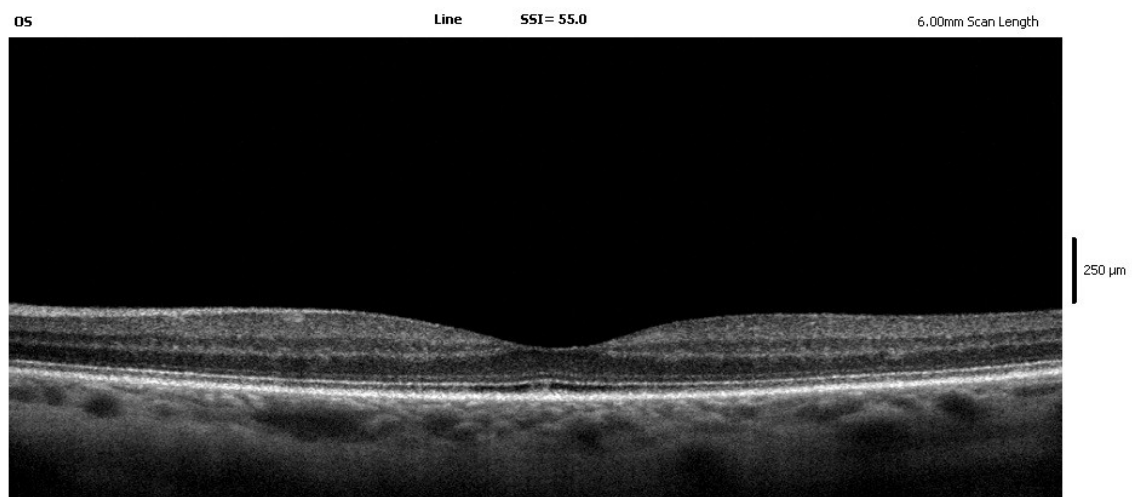


Abbildung 3.5: OCT (Programm Crossline) mit Darstellung eines Normalbefundes.

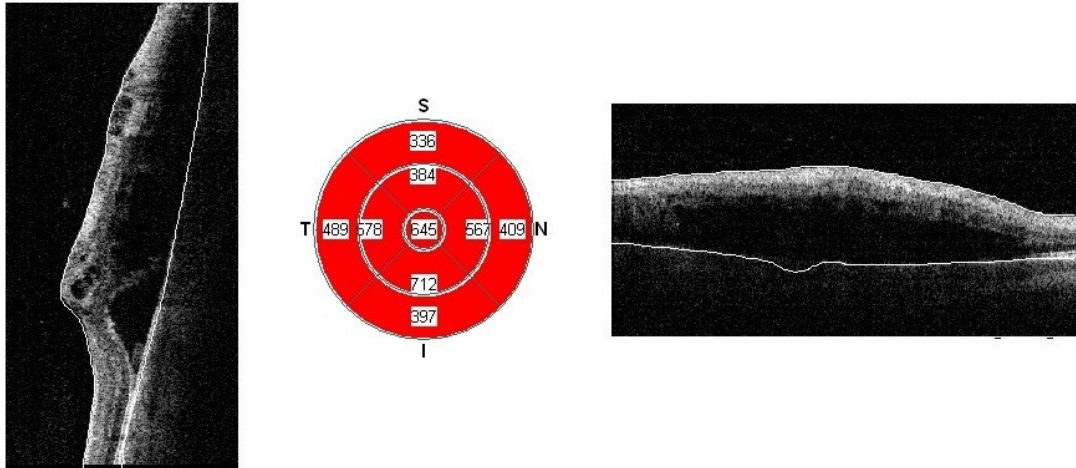


Abbildung 3.6: OCT (Programm EMM-5) mit Darstellung des zystoiden Makulaödems in zwei Ebenen und Errechnung der zentralen Makuladicke (CMT) in der Einheit [µm].

### 3.1.2.3. Funduskopie

Vor jeder Operation eines Studienpatienten wurde eine indirekte Funduskopie an einer Spaltlampe von einem Oberarzt durchgeführt. Diese waren nicht in die Studie eingebunden und führten eine Bestimmung des Glaskörperadhäsionsstatus durch. In der Case Report Form (CRF) wurde „anliegend“, „abgehoben“ oder „nicht beurteilbar“ vermerkt. Vor der Funduskopie wurden Mydriatika verabreicht und der Patient wurde auf ein Fahrverbot nach der Untersuchung hingewiesen.

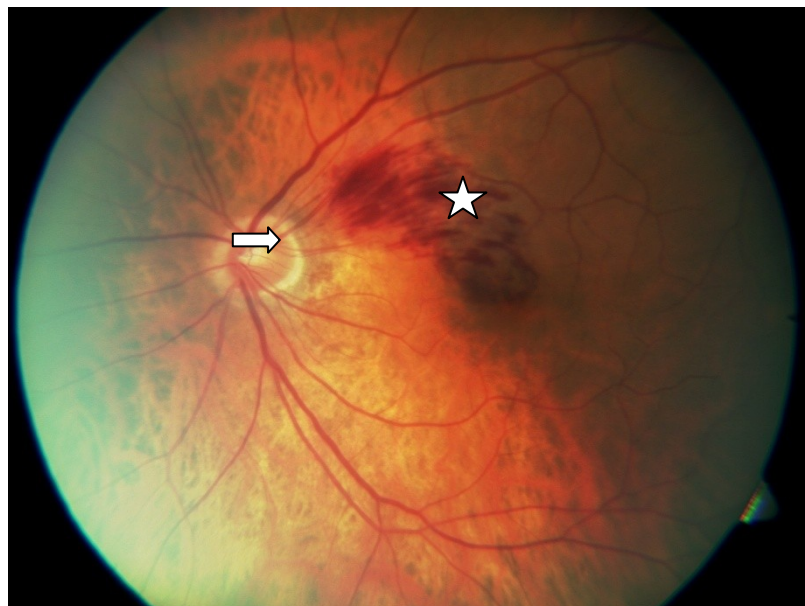


Abbildung 3.7: In der Spiegelung des Augenhintergrundes sind die typischen streifigen Netzhautblutungen (Stern) eines akuten superotemporalen Venenastverschlusses zu sehen (Pfeil).

#### **3.1.2.4. Sehschärfenbestimmung**

Die Sehschärfe wurde nach Festlegung der objektiven Refraktion mittels Gläserkasten (bestkorrigierter Fernvisus, BCVA) und einem Sehzeichenprojektor (Fa. Rodenstock) ermittelt. Die Durchführung ist standardisiert und in der Norm DIN 58220 beschrieben (Wesemann 2010). Es wurden in einer definierten Entfernung (5m) zwischen Untersuchungsstuhl und Leinwand Sehzeichen angeboten (sog. Optotypen). Erkannte der Patient die Optotypen auf dem Projektor nicht, wurde eine Sehprobetafel im Abstand von einem Meter angeboten oder eine respektive klinische Beurteilung durchgeführt (Finger zählen, Handbewegungen oder die Lichtprojektion einer Leuchte erkennen). Die Dokumentation erfolgte in Dezimalen.

Die klinische Sehschärfenbestimmung ohne Sehtafel wurde wie folgt umgerechnet:

Test	Sehschärfe
Finger zählen	0,025
Handbewegungen	0,0125
Licht einer Lampe erkennen	0,00625

**Tabelle 3.1: Umrechnung der klinischen Sehschärfe in Dezimale**

#### **3.1.2.5. Retinometer**

Bei Patienten mit einer Katarakt wurde, zusätzlich zur oben genannten Sehschärfenbestimmung, eine Retinometermessung vorgenommen. Hierbei wurde, mittels zwei interferenter Laserstrahlen in definierter Breite, das Auflösungsvermögen der Netzhaut getestet. Der Patient gab die Richtung der Streifen an und es erfolgte eine Abschätzung des nach Kataraktoperation zu erwartenden Visus (Lang et al. 2008).

#### **3.1.2.6. Augeninnendruckmessung (Tonometrie)**

Bei der ophthalmologischen Voruntersuchung der Patienten vor der Operation wurde standardgemäß der intraokuläre Druck gemessen. Es wurde eine Applanationstonometrie nach Goldmann an der Spaltlampe (Fa. Haag-Streit) durchgeführt. Hierzu wurde das Auge mit 1-2 Tropfen Lokalanästhetikum (Novesine 0,4%; Fa. Omnivision) und Fluoresceinlösung (Fluorescein 0,5%, Apotheke Universitätsklinikum Marburg) vorbehandelt und mit dem Druckkörperchen mit der

Auflagefläche 7,35 mm<sup>2</sup> unter Blaulicht der zur Applanation der Cornea notwendige Druck ermittelt. Es wurde an beiden Augen gemessen (erst rechts, dann links) und der Druck in der Einheit mmHg im CRF festgehalten.

### **3.1.3. Probenentnahme „Studie 2010“**

#### **3.1.3.1. Entnahme der Vorderkammerflüssigkeit**

Bei einem Teil des Studienkollektivs entnahmen wir Kammerwasser aus der Vorderkammer im Rahmen einer Kataraktoperation. Nach der lokalen Desinfektion und Anästhesie wurde durch den Operateur am Rande der Hornhaut eine Parazentese durchgeführt. Diese dient als Zugang der Operationsinstrumente und der späteren Kunstlinse. Die Operation wurde fast ausschließlich durch extrakapsuläre Kataraktextraktion mit Phakoemulsifikationstechnik durchgeführt.

Nach der Parazentese tritt Kammerwasser aus der Vorderkammer aus und wird durch ein Gel ersetzt. In dieser Studie wurde Kammerwasser nach der Parazentese mittels Insulinspritze (1 ml) und Kanüle aspiriert. Es wurde ein Probevolumen von 250 µl angestrebt. Diese Entnahmemethode wurde evaluiert und veröffentlicht. Es ergaben sich keine Komplikationen und sie galt als sicher (Bertelmann et al. 2012).

Direkt nach der Entnahme des Kammerwassers wurde dieses mit einer Citratpufferlösung im Verhältnis 1:1 mittels einer Eppendorf©-Pipette vermischt. Diese Pufferlösung wurde mit einer 3,13 prozentigen Natriumcitratlösung hergestellt (EIFELFANGO, Bad Neuenahr-Ahrweiler, Lösung mit Kochsalz 0,9% im Verhältnis 1:4). Nach der Pufferung wurden die Proben in einem -20°C kalten Gefrierschrank eingefroren.

#### **3.1.3.2. Entnahme der Glaskörperproben**

Zur Untersuchung der Fibrinolytika im Glaskörper akquirierten wir elf Patienten, bei denen eine Vitrektomie geplant war. Bei der pars plana Vitrektomie (ppV) werden die drei ca. 0,9 mm breiten Instrumente im Bereich der pars plana des Ziliarkörpers eingebracht, da dort die Gefahr einer iatrogenen Ablatio retinae am geringsten ist. Mit einem Vitrektom (einem Saugschneidegerät) wird der Glaskörper sukzessive entfernt.



Der intraokuläre Druck wird durch Applikation einer Infusionslösung konstant gehalten (Machemer 1971; O'Malley 1975).

Bei den Studienpatienten wurde eine „Glaskörperfalle“, ein steriler Aspirationsschlauch mit eingesetzter Eppendorf®-Eprovette, zwischen das Vitrektom und das Absauggerät gesetzt, um ca. 500 µl Glaskörper zu aspirieren (Schmidt et al. 2007).

Die Aufbereitung der Proben erfolgte analog zu der Kammerwasserentnahme mittels Pufferung mit 3,13% Citratpuffer im gleichen Volumenverhältnis. Die Aufbewahrung erfolgte ebenfalls im -20°C kalten Gefrierschrank.

#### **3.1.4. Laboranalysen „Studie 2010“**

Die Laboruntersuchungen wurden in zwei verschiedenen Laboren durchgeführt. Die Analysen der Fibrinolytika in Citratblut und Glaskörper- und Kammerwasserproben wurden im Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, unter der Leitung von Herrn PD Dr. med. Ulrich Sachs, durchgeführt.

Die verwendeten Kits waren:

- SIEMENS INNOVANCE D-Dimer
- SIEMENS Berichrom Plasminogen
- SIEMENS Berichrom a2-Antiplasmin
- SIEMENS Berichrom PAI
- TECHNOZYM(R) PAP Complex ELISA Kit (Fa. technoclone)

Der INNOVANCE D-Dimer Assay bestimmte die D-Dimer Konzentration in einem Messbereich von 0,17 bis 4,4 mg/l. Die Messung der Plasminogenaktivität mit dem Berichrom Plasminogen Testkit erfolgte in der Einheit % der Norm (%N) mit einem Messintervall von 0 bis 150%. Durch den Berichrom a2-Antiplasmin Test konnte ebenfalls a2-Antiplasmin zwischen 0 und 150% der Norm gemessen werden. Plasminaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) wurde in U/ml zwischen 2,68 und 4,48 U/ml sicher

bestimmt. Die Plasmin-a2-Antiplasmin-Komplex (PAP) Bestimmung erfolgte in ng/ml und hatte ein Messintervall von 0 bis 514 ng/ml.

Das ELISA Verfahren, welches in den oben genannten Test-Kits genutzt wurde, ist 1971 erstmals publiziert worden (Engvall 1971, Van Weemen 1971). In unserem Fall wurden die nachzuweisenden Stoffe mittels „Sandwichmethode“ nachgewiesen. Hierbei ist eine Mikrotiterplatte mit einem Antikörper beschichtet und bindet die Fibrinolytika. Nach einer testspezifischen Inkubationszeit wird die Mikrotiterplatte mit Wasser ausgewaschen und ein zweiter Antikörper zur Detektion (*detection antibody*) hinzugefügt. Dieser bindet an eine andere Stelle als die Antikörper der Mikrotiterplatte und wird nach erneutem Waschen durch ein, zum Enzym passendes, chromogenes Substrat nachgewiesen: Es wird eine Farbreaktion ausgelöst. Mittels Farbumschlag oder Chemolumineszenz erfolgt der Nachweis (vgl. Rehm et al. 2010). Die quantitative Bestimmung erfolgt anhand einer Standardverdünnungsreihe.

Weitere Tests wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg (Direktor: Prof. Dr. med. Harald Renz), beauftragt.

Das sind:

- CRP (Einheit: mg/l)
- HbA<sub>1c</sub> (Einheit %)

Hier galt, dass die alters- und geschlechtsspezifischen Referenzwerte des Zentrallabors als „Normal“ angenommen wurden. In der statistischen Auswertung wurden diese Parameter nicht weiter verfolgt. Ein erhöhter HbA<sub>1c</sub> Anteil oder CRP-Wert galt als Ausschlusskriterium.

### **3.2. Studiendesign „Studie 2012“**

Die Folgestudie „Studie 2012“ wurde in Kooperation mit der Abteilung für Netzhaut- und Glaskörperchirurgie der Augenklinik der Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt. Die Grundsätze der Deklaration von Helsinki von 1975 (6 Revision von 2008) und der europäischen Leitlinien für „Good Clinical Practice“ (GCP) wurden beachtet. Die Ethikkommissionen der Goethe-Universität Frankfurt (Aktenzeichen

351/12) und der Philipps-Universität Marburg (Aktenzeichen 117/10) gaben im Vorfeld ein positives Votum ab. Wir verfolgten einen prospektiven Ansatz.

Die Studie war ein Wissensversuch und es gab keinen Auftraggeber. Die Firma Novartis Pharma AG, Nürnberg, hat die Studie finanziell unterstützt ohne Einfluss auf die Studiengestaltung, Durchführung, Auswertung oder Veröffentlichung zu nehmen.

### **3.2.1. Patientenrekrutierung „Studie 2012“**

Die Patienten wurden in den Studienzentren Frankfurt (Augenklinik der Goethe-Universität Frankfurt) und Marburg (Augenklinik des Universitätsklinikums Marburg) rekrutiert.

Es wurden Patienten um Teilnahme an der Studie gebeten, die einen frischen ZVV oder VAV erlitten (nicht älter als sechs Wochen) und bei denen eine ppV oder eine Kernvitrektomie (cppV) geplant war. Bei diesen Patienten lagen typische funduskopische Befunde für eine RVO vor. Eine Ergänzung durch eine Fundusphotographie oder Fluoreszenzangiographie erfolgte bei Bedarf zur Klassifizierung der Ischämie, Feststellung eventueller Hämorrhagien und zur Befundsicherung der Funduskopie. Zur Bildung einer Kontrollgruppe wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die eine ppV oder cppV erhalten sollten, ohne dass eine Störung der Blut-Retina-Schranke bekannt gewesen ist (Zum Beispiel Vitrektomie bei Macular pucker).

Alle Patienten wurden vor der Studienteilnahme ausführlich durch einen Arzt über die Risiken der ppV und der cppV aufgeklärt. Hierzu wurde ein standardisierter Aufklärungsbogen verwendet. Es wurden das Ziel und der Ablauf der Studie ausführlich besprochen und das Einverständnis zur Teilnahme schriftlich dokumentiert.

Studienpatienten mussten folgende Einschlusskriterien erfüllen:

- Der Patient war zwischen 18 und 85 Jahre alt.
- Er war im Vollbesitz seiner geistigen Kräfte.
- Es wurde eine ppV oder cppV vorgenommen.
- Es lagen keine Ausschlusskriterien vor.

Als Ausschlusskriterien für alle Studiengruppen wurden definiert:

- Vitreomakuläres Traktionssyndrom
- Neovaskularisationen (jeglicher Lokalisation)
- Intravitreale Medikamentengaben in der Anamnese
- Laserphotokoagulationen in der Anamnese
- Intraokuläre Operationen (inklusive Kataraktoperationen) in den letzten sechs Monaten
- Zeichen einer Glaukomerkrankung
- Diabetische Netzhautveränderungen
- Intraokulärer Reiz- oder Entzündungszustand
- Traumata des Auges in der Anamnese
- Einnahme von Immunsuppressiva
- Malignome in der Anamnese
- Teilnahme an anderen Studien

### **3.2.2. Klinische Untersuchungsmethoden „Studie 2012“**

Wir untersuchten die Teilnehmer der Studie aller Gruppen mittels Sehschärfentestung, OCT, Fundusphotographie und Fluoreszenzangiographie (FAG).

Ziele der Untersuchungen waren die Klassifikation der RVO und die Einteilung in *hämorrhagisch/nicht hämorrhagisch* sowie *ischämisch/nicht ischämisch*.

#### **3.2.2.1. Sehschärfenbestimmung**

Die Bestimmung der Sehschärfe erfolgte analog der Untersuchung der „Studie 2010“ (siehe oben).

#### **3.2.2.2. Funduskopie**

Bei jedem Studienpatienten wurde eine indirekte Funduskopie an einer Spaltlampe von einem Oberarzt durchgeführt. Es wurde auf klinische Zeichen eines retinalen Venenverschlusses (RVO) geachtet. Bei den Studienteilnehmern der Kontrollgruppe wurden Erkrankungen des hinteren Augenabschnittes ausgeschlossen, die mit einer Blut-Retina-Schrankenstörung einhergehen.

Vor der Spaltlampenuntersuchung wurden Mydriatika (Tropicamid/Mydriaticum Stulln® und/oder Phenylephrinhydrochlorid/Neosynephrin-POS® 5%) verabreicht und die Studienteilnehmer wurden im Vorfeld über ein Fahrverbot nach der Untersuchung aufgeklärt.

#### **3.2.2.3. Fundusphotographie**

Bei unklarem ophthalmoskopischen Befund wurde eine Fundusphotographie mit einer Spiegelreflexkamera angefertigt (Kamera: Zeiss FF 450 plus IR, Sensor: JVC KY-F57U). Auch hier wurde ein Mydriaticum (Tropicamid/Mydriaticum Stulln® und/oder Phenylephrinhydrochlorid/Neosynephrin-POS® 5%) verabreicht. Das rotfreie Bild der Funduskamera stellt gut pathologische Prozesse der innersten Netzhautschicht dar (Lang et al. 2008). Wir beurteilten die Fundusbilder auf Zeichen einer Hämorrhagie.

#### **3.2.2.4. Fluoreszenzangiographie (FAG)**

Wir nutzten eine 50°-Fluoreszenzangiographie (OIS WinStation, 11KTM; CCS Pawlowksi GmbH, Jena) mit Fluoreszein. Es wurden 10 ml Fluoreszeinnatrium in die Kubitalvene injiziert. Durch ein Filtersystem wird das Fluoreszein in den Gefäßen der Netzhaut mit blauem Licht zur Fluoreszenz angeregt. Ein Sperrfilter vor der Spiegelreflexkamera hält den gelb-grünen Farbanteil zurück, sodass auf dem Bild nur die Fluoreszenz abgebildet wird.

#### **3.2.2.5. Spectral-Domain optische Kohärenztomographie**

Die OCT Messungen wurden mit einem Standard-Spectral-Domain OCT (3D OCT-2000; Topcon, Tokyo, Japan) durchgeführt. Als Einstellung wurde eine Scantiefe von 2,3 mm mit einer horizontalen Auflösung von 20 µm und einer longitudinalen Auflösung von 5-6 µm gewählt.

Ziel der Messungen war die Errechnung der zentralen Makuladicke (CMT) durch die Differenz der A-Scan Distanz der ILM und der Basalmembran des retinalen Pigmentepithels (RPE).

#### **3.2.3. Probenentnahme „Studie 2012“**

Für die „Studie 2012“ wurden ausschließlich Glaskörperproben untersucht. Diese wurden mittels zweier Verfahren entnommen: Mit der bereits beschriebenen ppV

(siehe Seite 24 f.) und mit einer core-pars-plana Vitrektomie (cppV). Dabei wurde ein 23 Gauge Vitrektor verwendet (Intrector®, Insight Instruments, Stuart, Florida, USA). Weiter wurde nur ein Gerätezugang benötigt. Die cppV gilt als komplikationsarm und sicher (Koch et al. 2011).

Die cppV fand ebenfalls im antiseptischen Operationsraum statt. Es wurde eine Desinfektion des Operationsgebietes vorgenommen, eine Lokalanästhesie durchgeführt und nach einer schrägen Sklerotomie die Spitze des Vitrektors im zentralen Glaskörper positioniert. Mittels Kopfophthalmoskop und 28-dpt-Linse wurde die Lage kontrolliert. Durch den Saugschneidapparat des Vitrektors wurde mit der Probengewinnung begonnen und direkt am Anfang der cppV aspirierte ein Assistent ca. 500 µl Glaskörperflüssigkeit für die Studie.

Der Operateur achtete auf den intraokulären Druck, um eine Bulbushypotonie zu vermeiden. Nach der Probenaspiration begann in den ZVV- und VAV-Gruppen die Infusion mit isotoner Lösung (BSS®, Alcon, Freiburg), sowie die Applikation von 1,25 mg (100 µl) Bevacizumab (Avastin®, Genentech, San Francisco, Kalifornien, USA) und 0,8 mg (200 µl) Dexamethason (Dexaratiopharm®, Ulm) in Anlehnung an die intravitreale Kombinationstherapie (Koss et al. 2012).

Bei Patienten der Kontrollgruppe wurde eine ppV mit 23-Gauge Vitrektom als konventionelle ppV durchgeführt. Nach Einsetzen der drei Trokare wurden ca. 500 µl Glaskörperprobe entnommen, bevor die Infusion mittels isotoner Lösung (BSS®, Alcon, Freiburg) geöffnet wurde, um eine Verdünnung der Glaskörperflüssigkeit zu vermeiden.

Die Glaskörperproben aller drei Studiengruppen (ZVV-Gruppe, VAV-Gruppe, Kontrollgruppe) wurden direkt nach der Entnahme unverdünnt und ohne Zusatz weiterer Reagenzien in 1,5 ml Eppendorf®-Gefäße pipettiert und direkt in einem Gefrierschrank (-20°C) eingefroren.

Die Aufbereitung der Proben vor der Laboranalyse war für alle drei Studiengruppen gleich. Nach dem Auftauen auf 23°C wurden 200 µl Glaskörperprobe mit 200 µl 5% Humanalbuminlösung (CSL Behring, Marburg) mittels einer Pipette vermischt. Von

dieser Lösung wurden wiederum 200 µl mit der Pipette entnommen und mit 200 µl Arginin (pH 8,6) vermischt und dadurch stabilisiert (Stief 2012).

#### **3.2.4. Laboranalysen „Studie 2012“**

Wir bestimmten in den Glaskörperproben die Plasminogenaktivität (des funktionellen Plasminogens), die PAP-Konzentration, die VEGF-Konzentration und die Konzentration des D-Dimers. Alle Verfahren sind nach der ELISA Methode durchgeführt worden.

Die Messung des funktionellen Plasminogens erfolgte chromogen nach Aktivierung von Plasminogen mit Streptokinase (Chromogenix-Hämachrom, Essen). In diesem Fall wird die Farbänderung des Substrates bei der Aktivierung mit Streptokinase mit einem Photometer gemessen. Die Intensität der Farbe steigt mit der Konzentration.

Die PAP-Konzentration wurde mittels ELISA (DRG Marburg) am PHOmo (Mikroplattenphotometer, Anthos, Krefeld) bestimmt. Auch hier kann die Absorption der Patientenproben nach enzymatischer Aktivierung mit Standardreihen verglichen und dadurch auf die Konzentration des PAP in der Probe geschlossen werden.

Für die Bestimmung der VEGF-Konzentration wurden die mit Arginin stabilisierten Proben verwendet (ELISA: Chemiluminescence Elisa Quantiglo-VEGF kit, R&D Wiesbaden). Bei dieser Bestimmung wird ein Luminol-verstärkter Lumineszenztest am LUmo (Mikroplattenluminometer, Anthos, Krefeld) durchgeführt. Bei einem Lumineszenztest wird durch ein Photometer die Lichtemission aus der chemischen Reaktion gemessen. Auch hier kann durch den Vergleich einer Standardkurve und Mehrfachmessung auf die Konzentration des Substrates geschlossen werden.

#### **3.3. Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS 14.0 (IBM) genutzt. Tabellen und Diagramme wurden mittels SPSS 14.0 (IBM), Office Word 2007 (Microsoft) und Office Excel 2007 (Microsoft) erstellt.

Im Vorfeld der Studie 2010 wurde mit Frau Dr. Nina Timmesfeld aus dem Institut für medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg eine statistische Beratung durchgeführt.

Zur Analyse von unverbundenen Stichproben mit mehr als zwei Gruppen nutzten wir den Kruskal-Wallis Test (Studie 2010: Visus, CMT, Glaskörperstatus, D-Dimere, Plasminogen,  $\alpha$ 2-Antiplasmin, PAP; Studie 2012: Plasminogen, VEGF-A, PAP, D-Dimere und Alter), bei zwei Gruppen den Mann-Whitney-U-Test (Studie 2012: Visus und CMT). Der Vergleich zweier nominalskaliert Variablen wurde mittels eines zweidimensionalen  $\chi^2$ -Test berechnet. Bei genau zwei Gruppenvariablen wurde der Cramérs Index errechnet (Studie 2012: Hämorrhagien in der Fundusphotographie und Ischämien im FAG). Korrelationen wurden mit dem Spearman Rangkorrelationkoeffizient errechnet. Ein signifikantes Ergebnis wurde bei p-Werten  $< 0,05$  angenommen.



## 4. Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der „Studie 2010“

Es wurden bei der Auswertung auch Daten einer Vorgängerstudie verwendet, welche die Konzentrationen von Fibrinolytika bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration (AMD) und diabetischer Retinopathie untersucht hat. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Marburg unter der Nummer 94/09 genehmigt. Die Ergebnisse wurden in einer Dissertation und einem Fachartikel ausgewertet und veröffentlicht (Spychalska 2013, Bertelmann et al. 2013). Patienten mit VAV und ZVV konnten nicht gewonnen werden. Anhand der folgenden Daten kann in der Diskussion aufgezeigt werden, weshalb die Methoden zur Studie 2012 geändert wurden.

Wir haben insgesamt 105 Augen eingeschlossen, bei denen entweder Kammerwasser, Glaskörperflüssigkeit oder beides entnommen wurde. Es wurden 97 Kammerwasserproben und 11 Glaskörperproben untersucht, davon sechs Patienten mit Entnahme beider Proben. 39 Patienten hatten eine AMD, acht eine diabetische Retinopathie, ein Patient hatte sowohl einen Zentralvenenverschluss als auch eine AMD und 57 Patienten waren in der Kontrollgruppe. Die weiteren epidemiologischen Maßzahlen sind in folgender Tabelle aufgeführt:

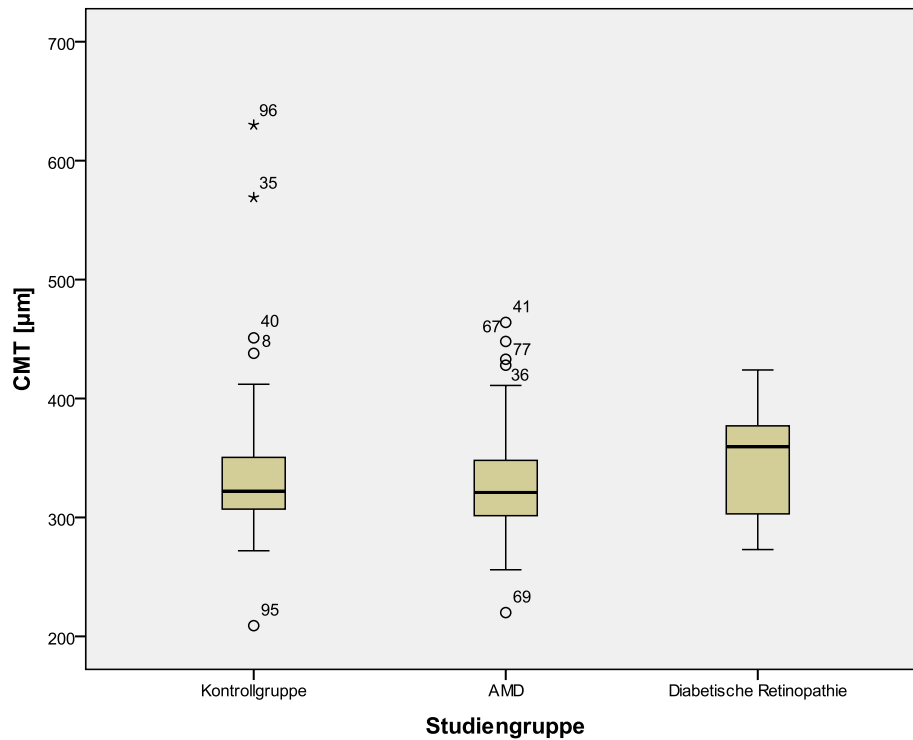
		Erkrankung				Gesamt
		Kontrollgr.	AMD	DR	ZVV + AMD	
Geschlecht	männlich	22	16	5	0	43
	weiblich	35	23	3	1	62
Gesamt		57	39	8	1	105
Alter der Patienten		68,5 ± 1,6	76,2 ± 1,2	64,5 ± 3,9	87	71,2 ± 11,2

**Tabelle 4.1:** Kreuztabelle der Häufigkeiten. Kontrollgr. = Kontrollgruppe, DR = Diabetische Retinopathie, AMD = Altersbedingte Makuladegeneration, ZVV = Zentralvenenverschluss

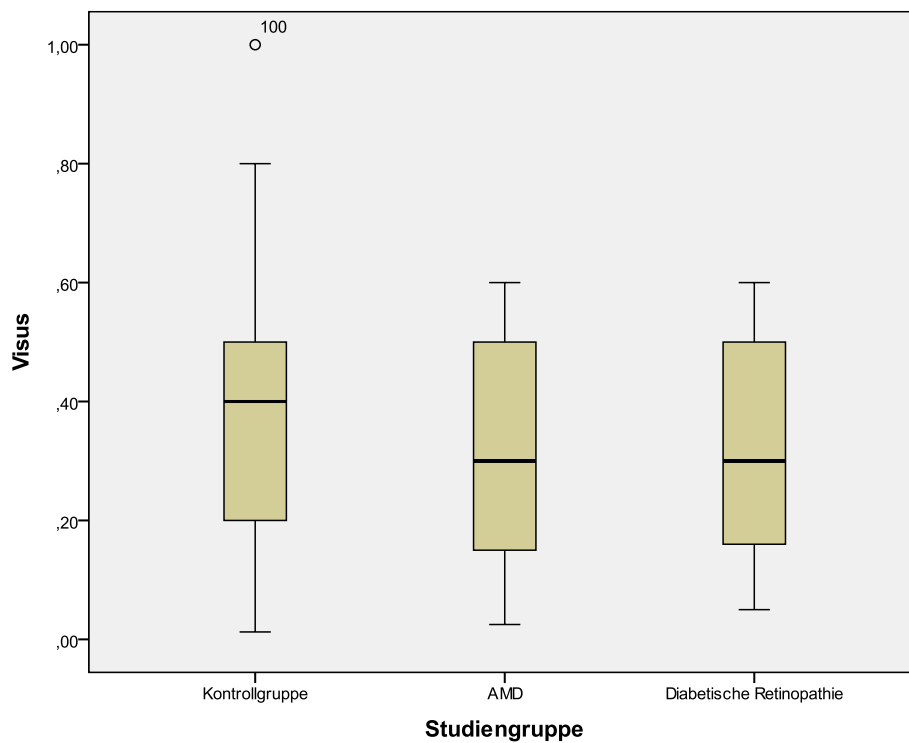
Bei allen Probanden wurden Visus (BCVA) und zentrale Makuladicke (CMT) bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten Verteilungen festgestellt werden. Die Gruppe „ZVV+AMD“ wurde nicht eingerechnet, da es nur einen Wert gab.

	Erkrankung			Gesamt	Signifikanz (p-Wert)
	AMD	Diabetische Retinopathie	Kontrollgruppe		
Visus	0,3 ± 0,14 (N=36)	0,32 ± 0,2 (N=6)	0,38 ± 0,21 (N=55)	0,33 ± 0,2	0,072
CMT [µm]	331 ± 54 (N=36)	349 ± 54 (N=6)	339 ± 65 (N=55)	337 ± 60	0,59

**Tabelle 4.2: Mittelwerte und Standardabweichungen des Visus und der zentralen Makuladicke in den verschiedenen Studiengruppen.**



**Abbildung 4.1: Boxplot Diagramm der CMT (p = 0,59, Kruskal-Wallis-Test)**



**Abbildung 4.2: Boxplot Diagramm des Visus ( $p = 0,072$ ; Kruskal-Wallis-Test)**

Wir erhoben bei den Probanden mittels Sonographie, OCT und Funduskopie den Adhäsionsstatus des Glaskörpers. Auf die Studiengruppen ergab sich folgende Verteilung:

	Studiengruppe				Gesamt
	Kontroll- gruppe	AMD	Diabetische Retinopathie	AMD+ZVV	
Glaskörper anliegend	20	14	3	1	38
Glaskörper partiell abgehoben	20	13	4	0	37
Glaskörper komplett abgehoben	15	11	1	0	27
Nicht beurteilbar	2	1	0	0	3
Gesamt	57	39	8	1	105

**Tabelle 4.3: Glaskörperstatus in den verschiedenen Studiengruppen.**

Der Glaskörperstatus zeigt keine signifikante Abhängigkeit von der Zugehörigkeit zu einer Studiengruppe (Näherungsweise Signifikanz  $p = 0,38$ ; Kruskal-Wallis-Test)

Die Glaskörper- und Kammerwasserproben wurden auf Plasminogen,  $\alpha 2$ -Antiplasmin, D-Dimere, Plasmin-Antiplasmin-Komplex und PAI-1 untersucht. Es stand nicht immer genügend Probenmaterial für die Analyse aller Parameter zur Verfügung. Hier ergab sich eine Priorisierung, sodass zuerst die D-Dimere, dann das  $\alpha 2$ -Antiplasmin, dann das Plasminogen und schließlich der Plasmin- $\alpha 2$ -Antiplasmin-Komplex und der Plasminaktivator-Inhibitor-1 bestimmt wurden.

#### **4.1.1. Untersuchung der Kammerwasserproben**

Plasminogen konnte im niedrigen Bereich zwischen 0,00 und 1 % der Norm nachgewiesen werden. Es gab einen stark abweichenden Wert in der AMD Gruppe (Studienpatient 28: Plasminogen = 394,5 % d.N.), der aus der Berechnung als Ausreißer ausgeschlossen wurde.

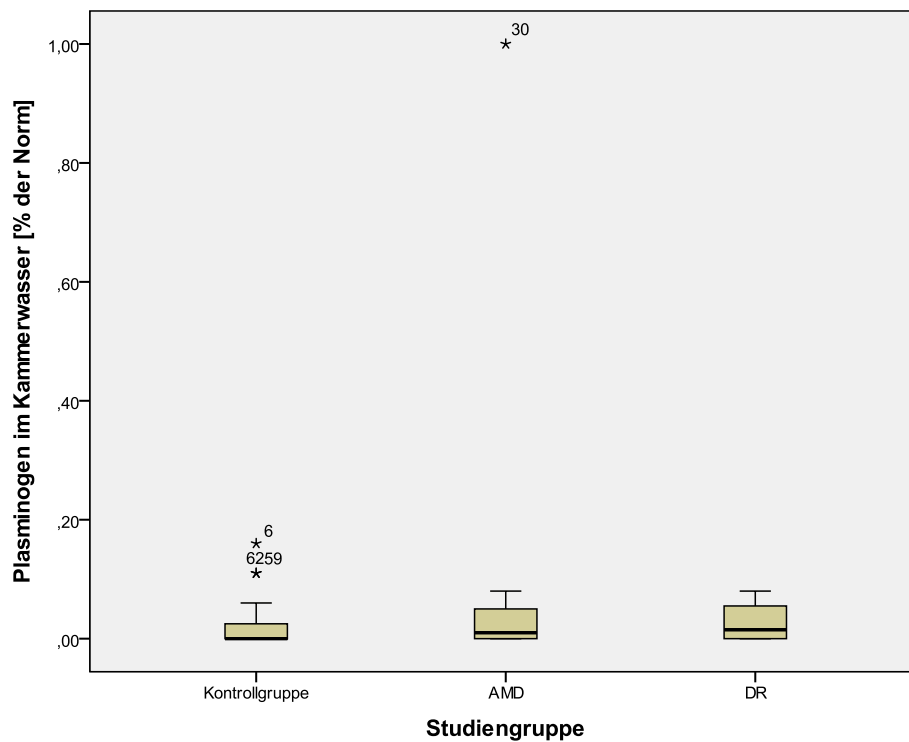
$\alpha 2$ -Antiplasmin konnte in geringer Konzentration in der Kontrollgruppe und der AMD-Gruppe aufgezeigt werden. Bei den Patienten mit diabetischer Retinopathie wiesen wir es nicht nach. Es zeigte sich keine signifikante Verteilung.

D-Dimer wurde in allen Gruppen stets mit 0,17 mg/l bestimmt. PAI-1 konnte in keiner Kammerwasserprobe nachgewiesen werden (N=47)

In der Studiengruppe „AMD und ZVV“ wurde kein Kammerwasser, sondern nur eine Glaskörperprobe entnommen.

	Studiengruppe			Signifikanz (p-Wert)
	Kontrollgruppe	AMD	Diabetische Retinopathie	
Plasminogen [%d.N.]	0,02 ± 0,036 (N=43)	0,055 ± 0,183 (N=10)	0,028 ± 0,038 (N=4)	0,61
α2-Antiplasmin [U/ml]	0,52 ± 1,7 (N=47)	1,32 ± 3,1 (N=33)	0 (konstant) (N=5)	0,209
Plasmin-Alpha-2- Antiplasmin- Komplex [ng/ml]	17,43 ± 6,06 (N=14)	17,5 ± 5,76 (N=16)	17 (N=1)	0,917

**Tabelle 4.4: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fibrinolytika in den Studiengruppen.**  
**Nicht abgebildet: D-Dimer und PAI-1. Signifikanzberechnung mittels Kruskal-Wallis-Test.**



**Abbildung 4.3: Boxplot Diagramm des Plasminogen im Kammerwasser (p = 0,61; Kruskal-Wallis-Test)**

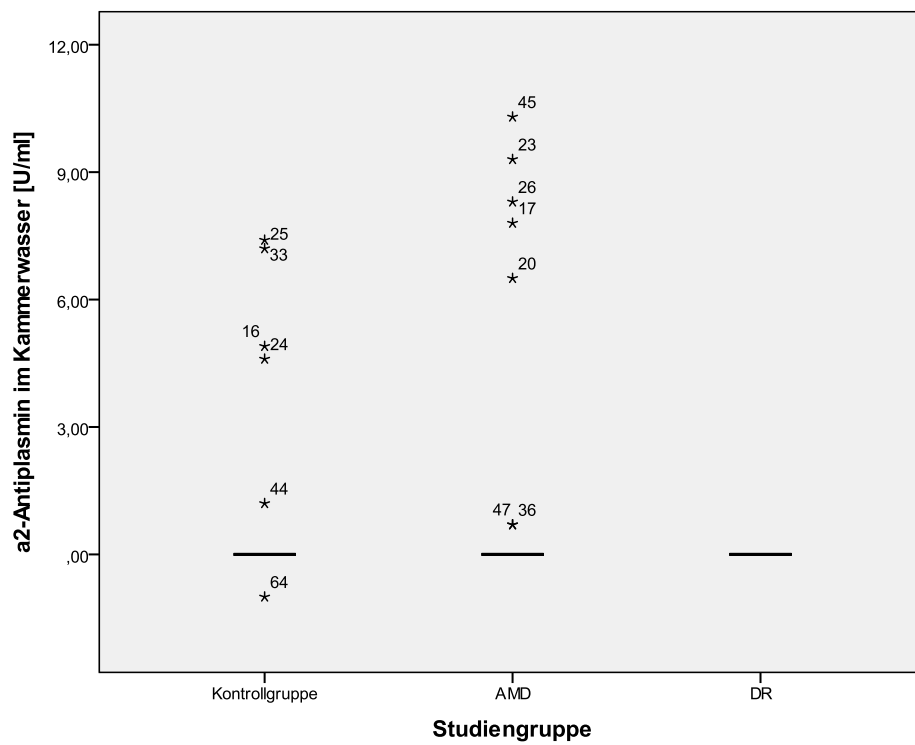


Abbildung 4.4: Boxplot des Alpha-2-Antiplasmin im Kammerwasser ( $p = 0,209$ ; Kruskal-Wallis-Test)

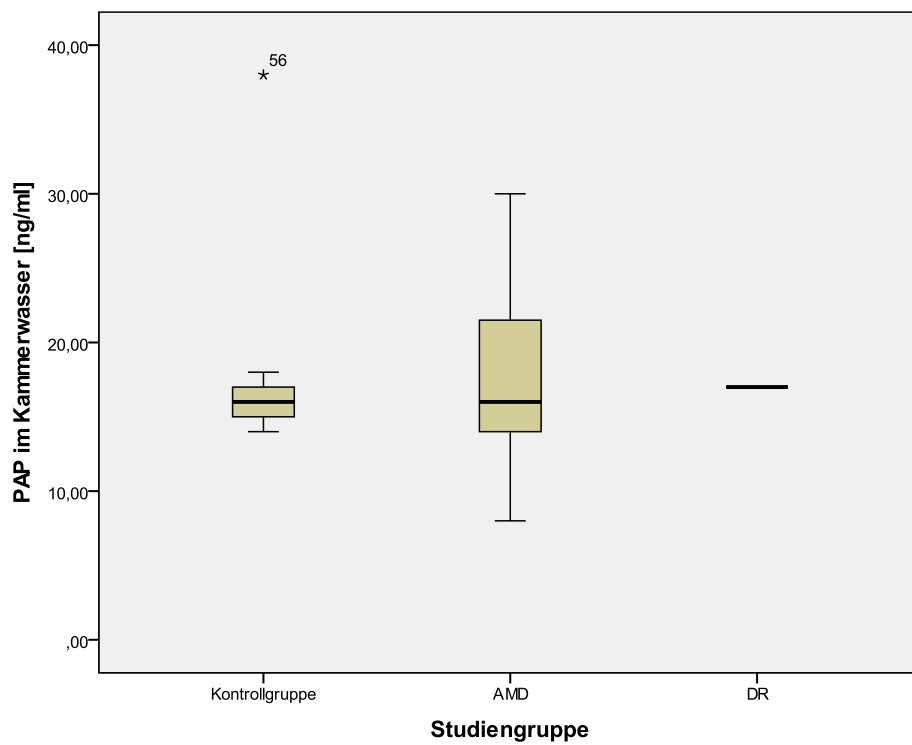


Abbildung 4.5: Boxplot des Plasmin-Alpha2-Antiplasminkomplex im Kammerwasser ( $p = 0,917$ ; Kruskal-Wallis-Test)

#### 4.1.2. Untersuchung der Glaskörperproben

Wir konnten die Glaskörperproben zu elf Patienten auswerten. Aufgrund der ausreichenden Probenmenge konnten stets alle Parameter bestimmt werden. Plasminogen, Plasminaktivator-Inhibitor 1, D-Dimere und der Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin-Komplex konnten in allen Proben aller Subgruppen bestimmt werden. Dabei zeigte sich keine signifikante Verteilung unter den Studiengruppen. Das  $\alpha$ 2-Antiplasmin konnte nur in der Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Plasminaktivatorinhibitor-1 konnten wir nicht im Glaskörper nachweisen.

	Studiengruppe				
	Kontroll- gruppe	AMD	Diabetische Retinopathie	AMD+ZVV	Signifikanz (p-Wert)
Plasminogen [%d.N.]	0,656 $\pm$ 0,792 (N=5)	2,135 $\pm$ 2,963 (N=2)	1,683 $\pm$ 2,744 (N=3)	9,7 (N=1)	0,61
$\alpha$ 2-Antiplasmin [U/ml]	1,36 $\pm$ 3,04 (N=5)	0 (konstant) (N=2)	0 (konstant) (N=3)	0 (N=1)	0,753
D-Dimer [mg/l]	0,35 $\pm$ 0,22 (N=5)	2,39 $\pm$ 3,14 (N=2)	1,83 $\pm$ 2,42 (N=3)	4,61 (N=1)	0,359
Plasmin-Alpha-2- Antiplasmin- Komplex [ng/ml]	13,2 $\pm$ 8,38 (N=5)	15,5 $\pm$ 2,12 (N=2)	18 $\pm$ 2 (N=3)	14 (N=1)	0,461

**Tabelle 4.5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Fibrinolytika in den Studiengruppen. Messung der Glaskörperproben. Nicht dargestellt: PAI-1. Berechnung der Signifikanzen mittels Kruskal-Wallis-Test.**

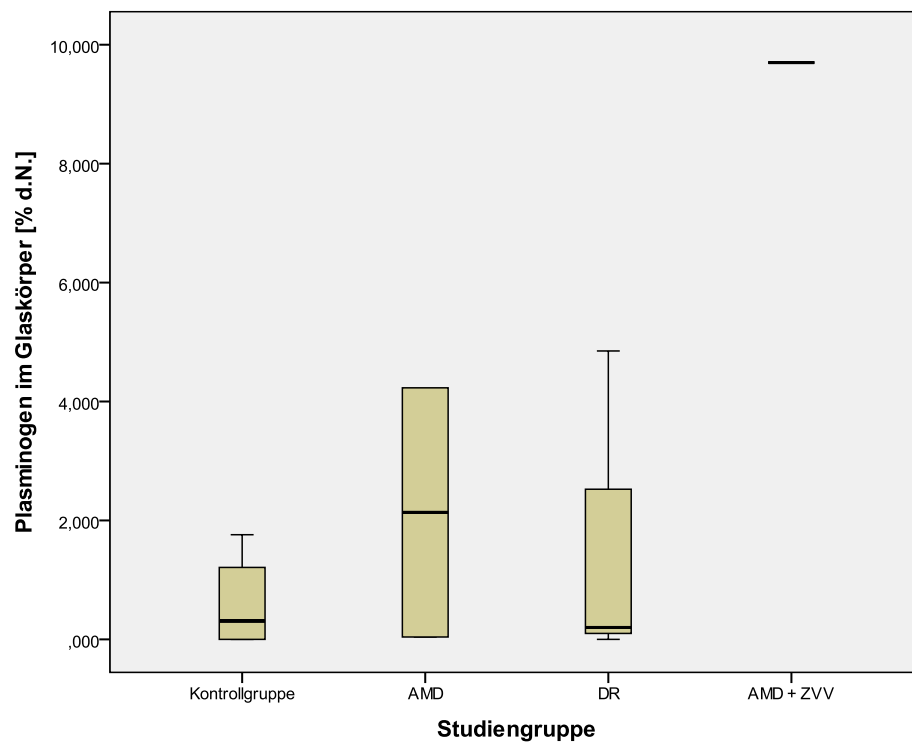


Abbildung 4.6: Boxplot des Plasminogen im Glaskörper ( $p = 0,415$ ; Kruskal-Wallis-Test)

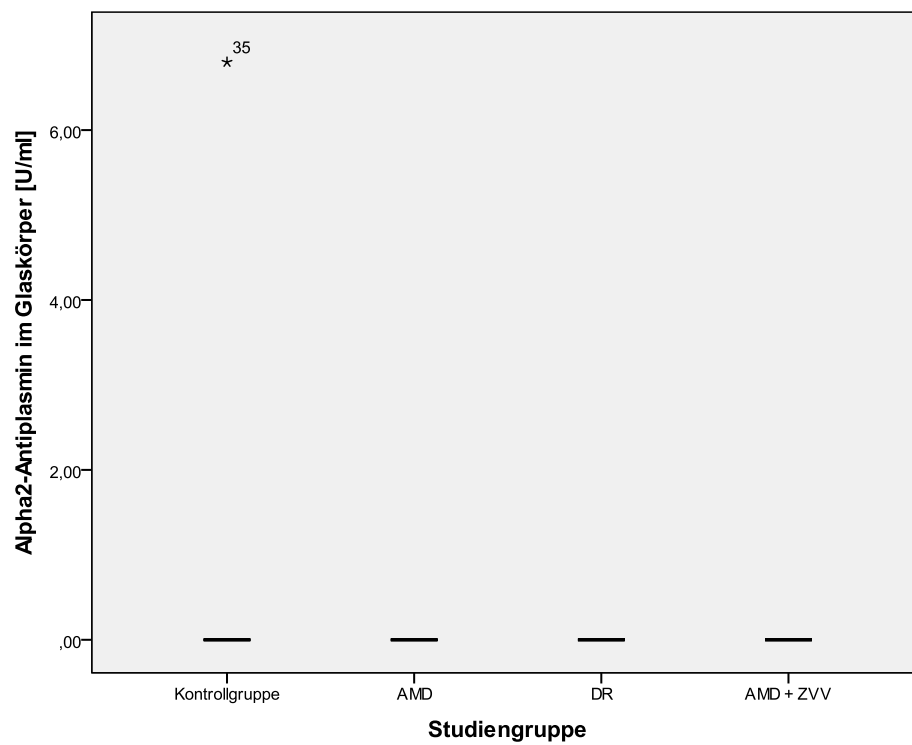


Abbildung 4.7: Boxplot des Alpha2-Antiplasmin im Glaskörper. Es wurde außer einem "Ausreißer" in der Kontrollgruppe kein Alpha-2-Antiplasmin nachgewiesen ( $p = 0,753$ ; Kruskal-Wallis-Test)



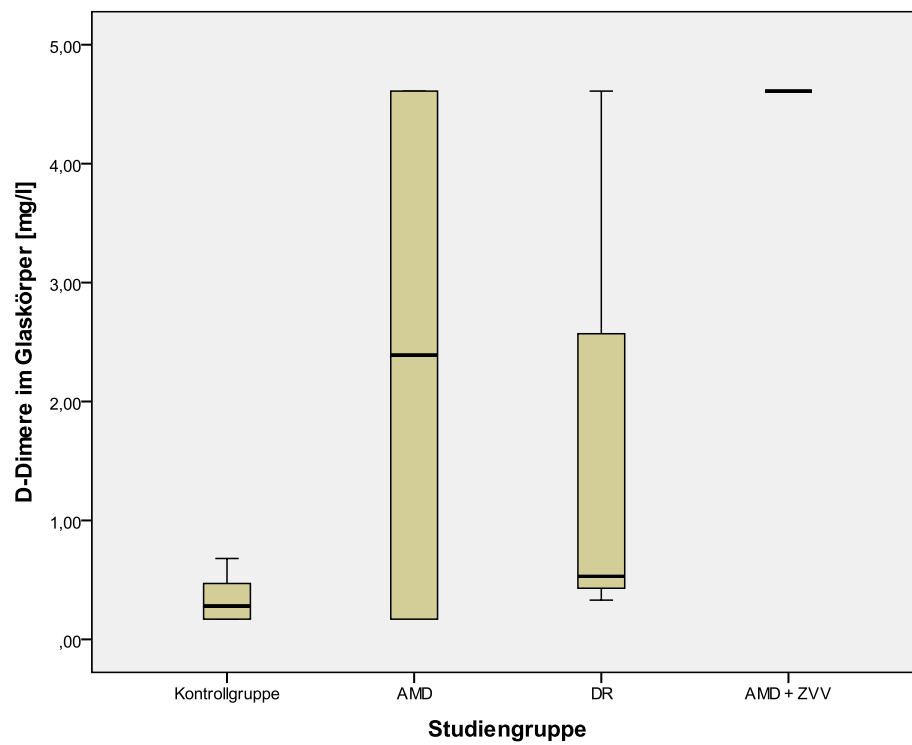


Abbildung 4.8: Boxplot der D-Dimere im Glaskörper ( $p = 0,359$ ; Kruskal-Wallis-Test)

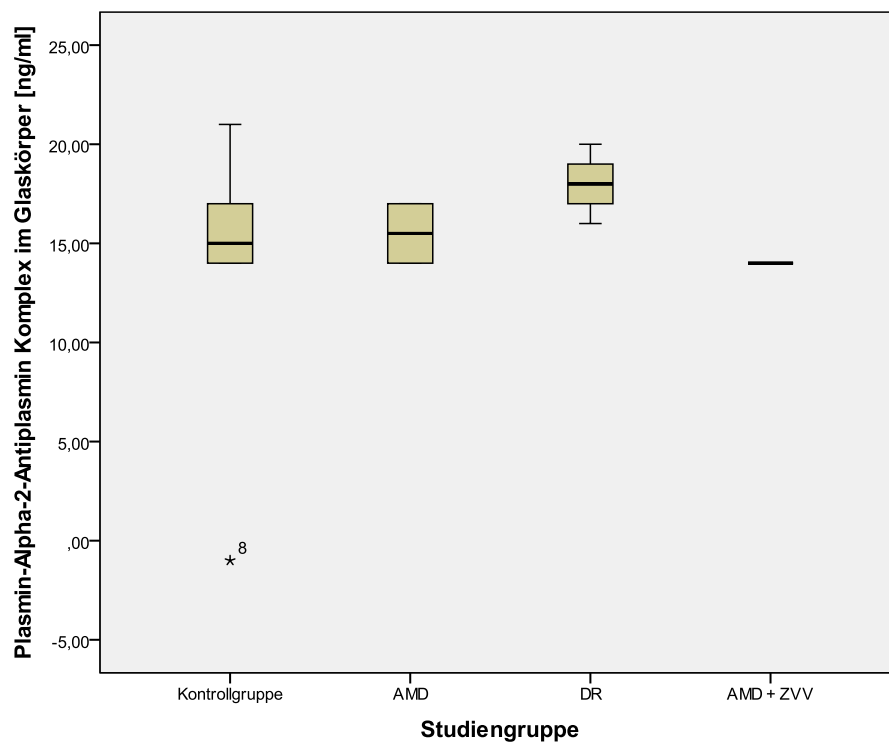


Abbildung 4.9: Boxplot des Plasmin-Alpha-2-Antiplasmin im Glaskörper ( $p = 0,461$ ; Kruskal-Wallis-Test)

## 4.2. Ergebnisse der „Studie 2012“

Es wurden 47 Augen von 47 Patienten in die Studie eingeschlossen. Dabei wurden 14 Patienten der ZVV-Gruppe, 22 Patienten der VAV-Gruppe und elf Patienten der Kontrollgruppe zugeordnet. Hierbei handelte es sich um 19 Patienten und 28 Patientinnen im Alter von 33 bis 89 Jahren. Ein signifikanter Unterschied der Altersverteilung der drei Gruppen bestand nicht ( $p=0,107$ ). Die epidemiologischen Maßzahlen und Charakteristika sind in folgender Tabelle aufgeführt:

		Erkrankung			Gesamt
		Kontrollgruppe	ZVV	VAV	
Geschlecht	männlich	5	5	9	19
	weiblich	6	9	13	28
Gesamt		11 (23 %)	14 (30 %)	22 (47 %)	47
Alter der Patienten		59,1 ± 14,1	69,7 ± 14,5	69,1 ± 12,6	67 ± 14

Tabelle 4.6: Kreuztabelle der Häufigkeiten

Die Sehschärfe, die CMT und eine Untersuchung der Fundusphotographie auf Hämorrhagie und der Fluoreszenzangiographie auf Ischämie wurden nur in der ZVV- und VAV-Gruppe durchgeführt.

Weder der Visus (BCVA), noch die CMT der Studiengruppen ZVV und VAV unterschieden sich signifikant.

	Erkrankung		Gesamt	Signifikanz (p-Wert)
	ZVV	VAV		
Visus	0,18 ± 0,13 (n=14)	0,25 ± 0,14 (n=22)	0,23 ± 0,14 (n=36)	0,116
CMT [µm]	415 ± 122 (N=11)	470 ± 152 (N=20)	450 ± 143 (N=31)	0,298

Tabelle 4.7: Visus und CMT bezogen auf die Studiengruppe

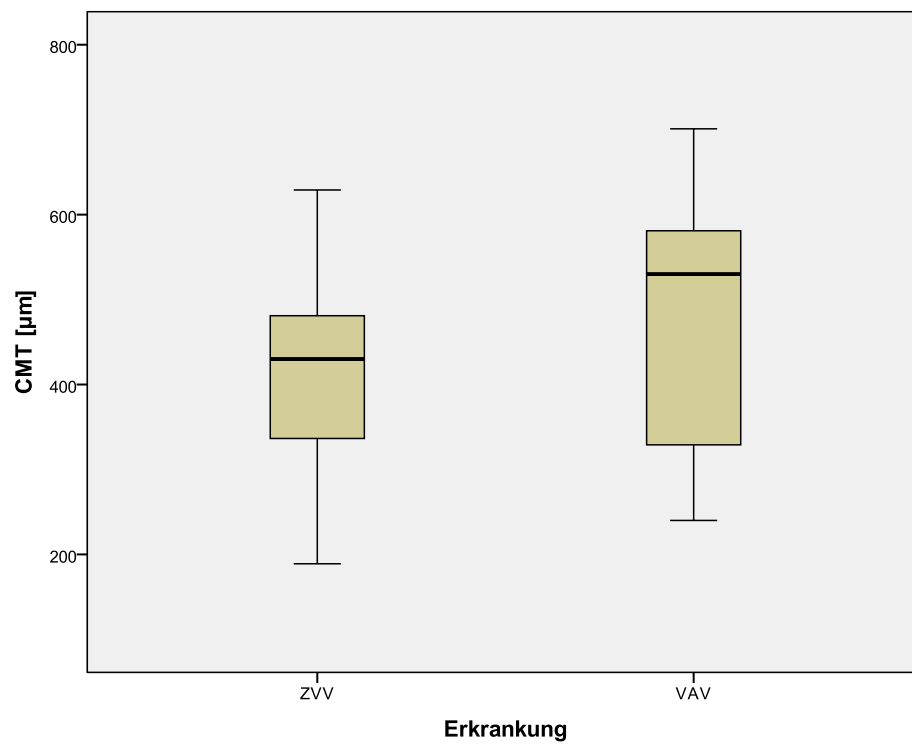


Abbildung 4.10: Boxplot Diagramm der CMT ( $p = 0,298$ , Mann-Whitney-U-Test)

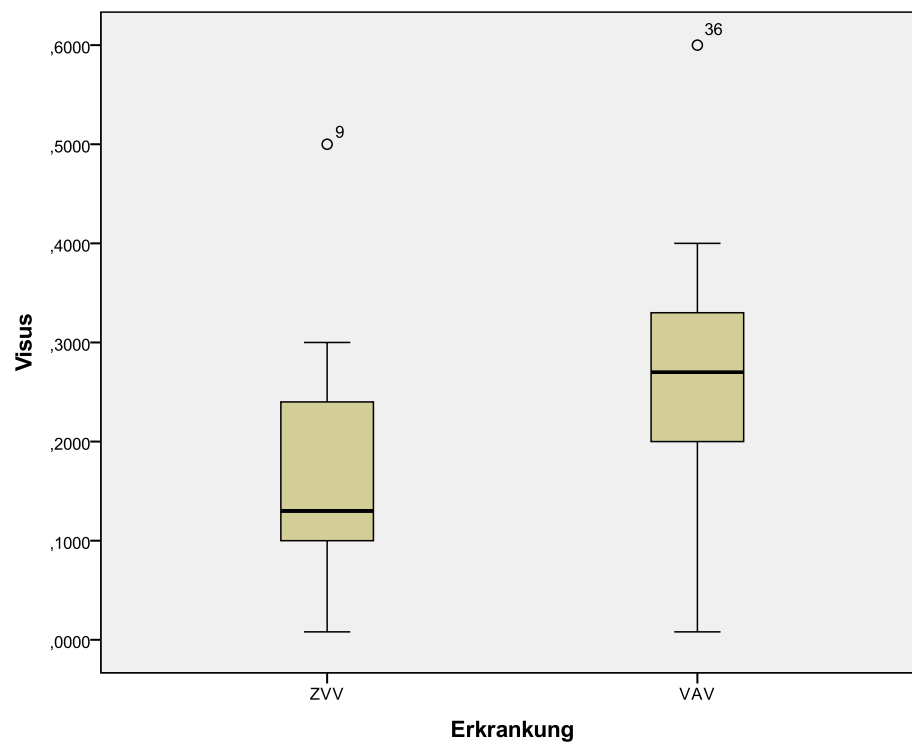


Abbildung 4.11: Boxplot Diagramm des Visus (BCVA) ( $p = 0,116$ , Mann-Whitney-U-Test)

Es wurden in der ZVV-Gruppe 13 Fundusphotographien angefertigt, in der VAV Gruppe 20. Dabei kam es zu keinem signifikanten Zusammenhang der Studiengruppe und dem Ergebnis der Fundusphotographie (Näherungsweise Signifikanz  $p=0,124$ ).

	Erkrankung		Gesamt
	ZVV-Gruppe	VAV-Gruppe	
nicht hämorrhagisch	5	3	8
hämorrhagisch	8	17	25
Gesamt	13	20	33

**Tabelle 4.8: Ergebnisse der Fundusphotographie**

Anhand angiographischer Ergebnisse wurden die RVO als ischämisch oder nicht ischämisch eingestuft. Im Falle einer ausgeprägten intraretinalen Blutung war die FAG nicht indiziert (7 Fälle in der ZVV-Gruppe, 8 Fälle in der VAV-Gruppe). Die Fälle, in denen die FAG nicht ausgewertet werden konnte, wurden als „nicht durchgeführt“ betrachtet.

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Studiengruppe und dem Ergebnis der FAG dargestellt werden (Näherungsweise Signifikanz  $p=0,717$ ).

	Erkrankung		Gesamt
	ZVV-Gruppe	VAV-Gruppe	
nicht-ischämisch	2	3	5
ischämisch	5	11	16
Gesamt	7	14	21

**Tabelle 4.9: Ergebnisse der FAG**

In allen drei Studiengruppen wurde aus den Glaskörperproben Plasminogen, VEGF-A, PAP und D-Dimere bestimmt. Hier ergab sich eine hochsignifikante Abhängigkeit der Plasminogen- und der VEGF-A-Konzentration von der Studiengruppenzugehörigkeit. Für die PAP- und D-Dimer Konzentrationen konnte keine signifikante Abhängigkeit aufgezeigt werden. Die Verteilung der D-Dimere legt zumindest eine Einflussgröße der Studiengruppe nahe ohne den statistischen Beweis zu ermöglichen. Weiter wurden mögliche Korrelationen der Konzentrationen der Komponenten des fibrinolytischen Systems miteinander und mit den klinischen Parametern CMT und BCVA geprüft.

Dabei korrelierte die Konzentration des funktionellen Plasminogens signifikant mit der Konzentration von VEGF-A ( $r = 0,476$ ,  $p = 0,001$ ) und mit der Konzentration von D-Dimeren ( $r = 0,583$ ,  $p = 0,001$ ). Zwischen der VEGF-A und D-Dimer Konzentration konnte auch eine signifikante Korrelation aufgezeigt werden ( $r = 0,398$ ,  $p = 0,032$ ). Zwischen der Konzentration des Plasminogens und der Konzentration des PAP konnte keine Korrelation ermittelt werden ( $r = -0,135$ ,  $p = 0,382$ ), wie auch nicht zwischen der Konzentration des VEGF-A und PAP ( $r = -0,103$ ,  $p = 0,506$ ) und PAP und D-Dimer ( $r = -0,64$ ,  $p = 0,757$ ).

Die CMT und die BCVA zeigten keine Korrelationen untereinander oder mit den Konzentrationen der Komponenten des fibrinolytischen Systems.

	Erkrankung			Signifikanz (p-Wert)
	Kontrollgruppe	ZVV	VAV	
Plasminogen [%N]	0,38 ± 0,63	2,07 ± 1,87	1,24 ± 1,12	< 0,001
VEGF [pg/ml]	104,91 ± 115,92	1268,71 ± 1318,46	527,77 ± 543,28	0,001
PAP [ng/ml]	9,74 ± 10,98	8,14 ± 7,07	6,96 ± 4,8	0,96
D-Dimere [ng/ml]	9,34 ± 14,48	60,94 ± 150,4	68,83 ± 94,75	0,296

**Tabelle 4.10: Konzentrationen der Fibrinolytika**

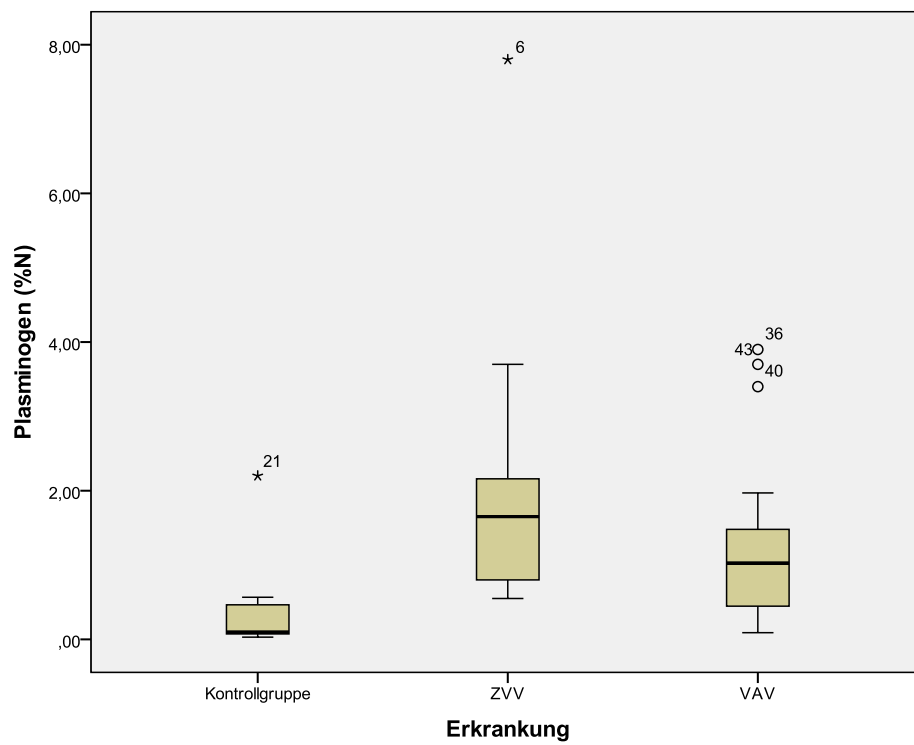


Abbildung 4.12: Boxplot-Diagramm Plasminogen ( $p < 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test)

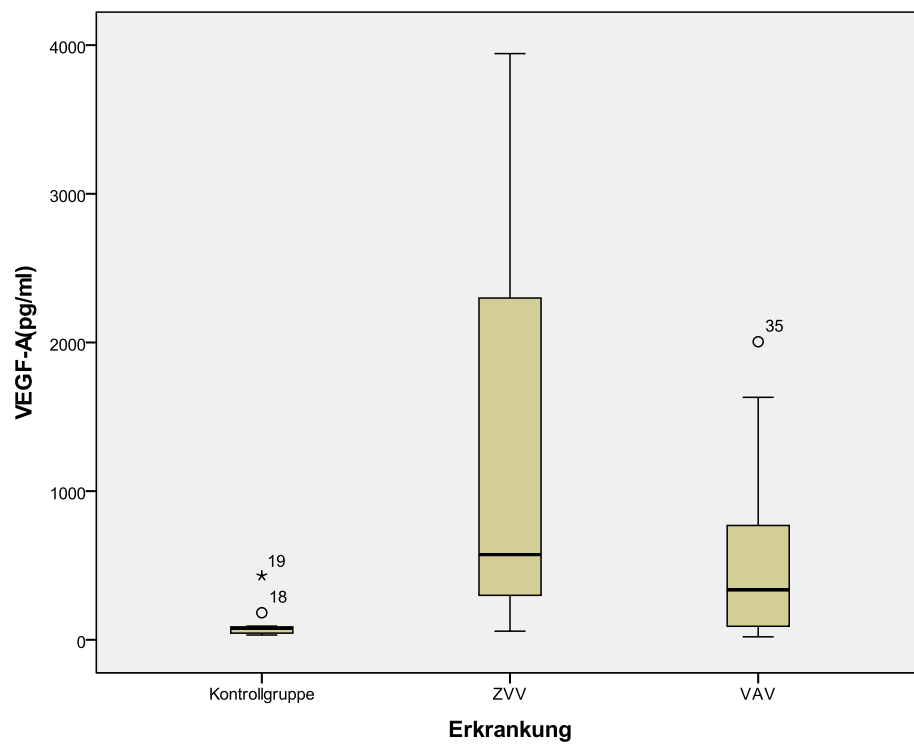


Abbildung 4.13: Boxplot-Diagramm VEGF-A ( $P = 0,001$ , Kruskal-Wallis-Test)

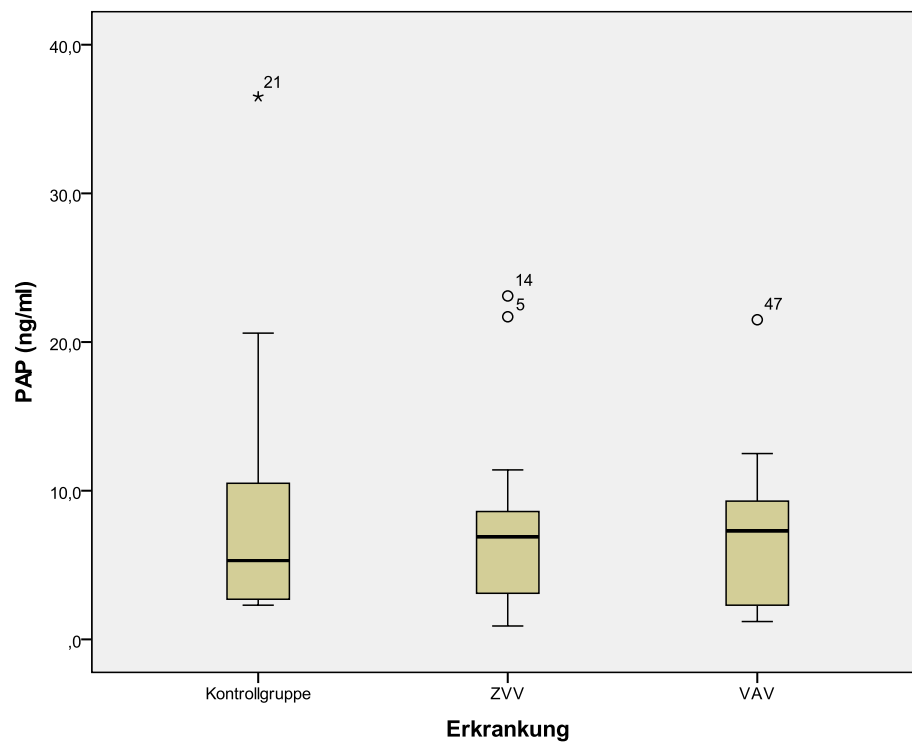


Abbildung 4.14: Boxplot-Diagramm PAP ( $p = 0,96$ , Kruskal-Wallis-Test)

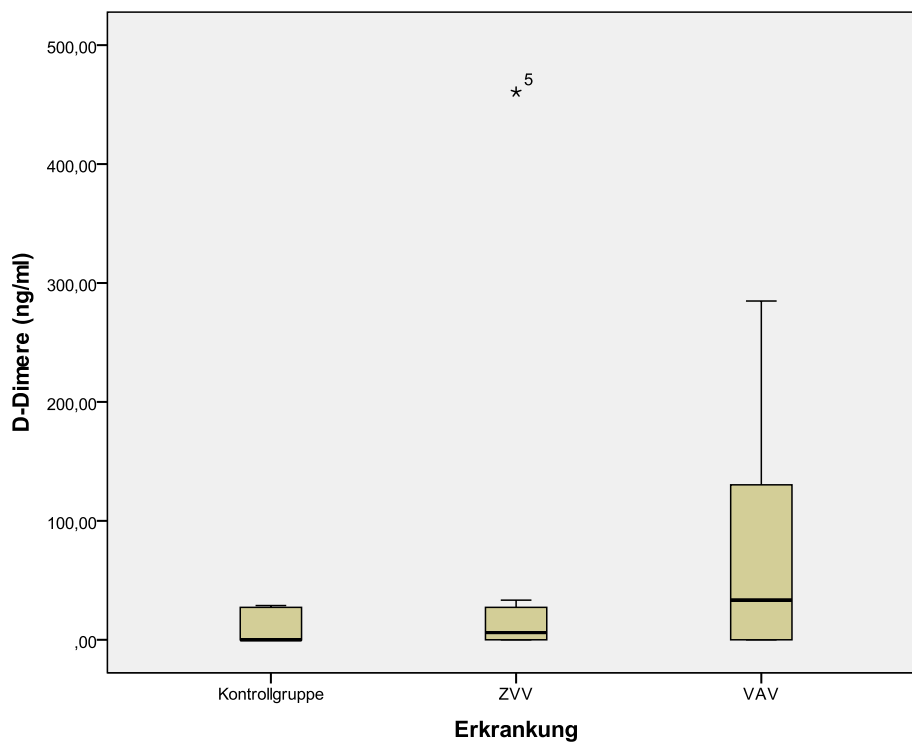


Abbildung 4.15: Boxplot-Diagramm der D-Dimere ( $p = 0,296$ , Kruskal-Wallis-Test)

	Visus	Plasminogen	VEGF-A	PAP	D-Dimere	CMT
Visus	$r = 1$	$r = -0,22$ $p = 0,198$	$r = -0,24$ $p = 0,159$	$r = 0,13$ $p = 0,462$	$r = 0,019$ $p = 0,931$	$r = -0,138$ $p = 0,458$
Plasminogen	$r = -0,22$ $p = 0,198$	$r = 1$	$r = 0,476$ $p = 0,001$	$r = -0,135$ $p = 0,382$	$r = 0,583$ $p = 0,001$	$r = -0,188$ $p = 0,311$
VEGF-A	$r = -0,24$ $p = 0,159$	$r = 0,476$ $p = 0,001$	$r = 1$	$r = -0,103$ $p = 0,506$	$r = 0,398$ $p = 0,032$	$r = -0,31$ $p = 0,870$
PAP	$r = 0,13$ $p = 0,462$	$r = -0,135$ $p = 0,382$	$r = -0,103$ $p = 0,506$	$r = 1$	$r = -0,064$ $p = 0,757$	$r = -0,231$ $p = 0,22$
D-Dimere	$r = 0,019$ $p = 0,931$	$r = 0,583$ $p = 0,001$	$r = 0,398$ $p = 0,032$	$r = -0,064$ $p = 0,757$	$r = 1$	$r = 0,016$ $p = 0,947$
CMT	$r = -0,138$ $p = 0,458$	$r = -0,188$ $p = 0,311$	$r = -0,31$ $p = 0,870$	$r = -0,231$ $p = 0,220$	$r = -0,016$ $p = 0,947$	$r = 1$

Tabelle 4.11: Spearman-Korrelation und Signifikanz (zweiseitig)

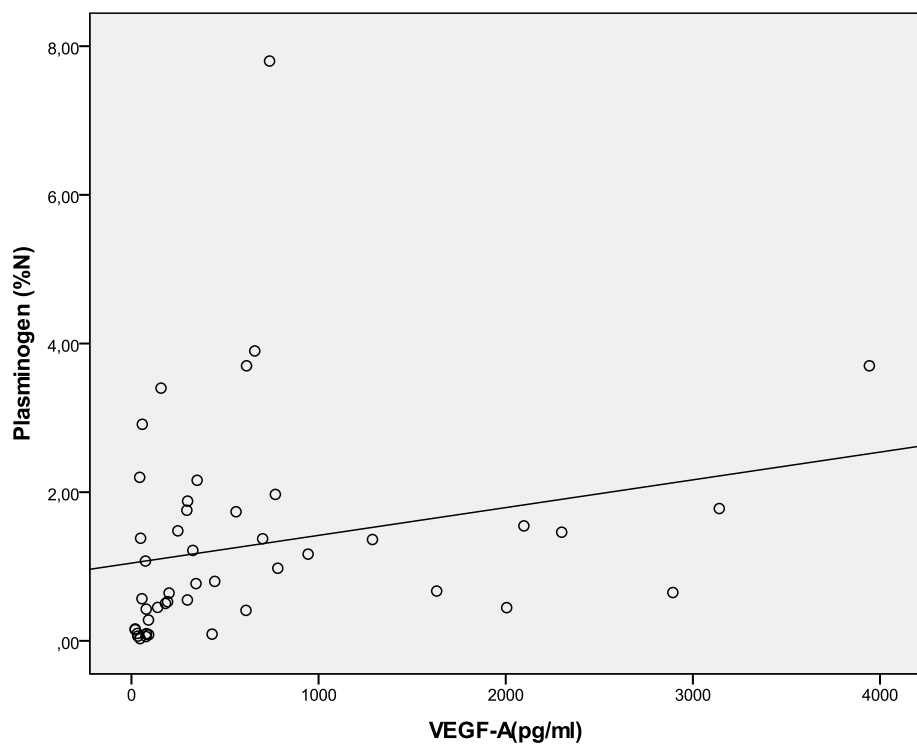
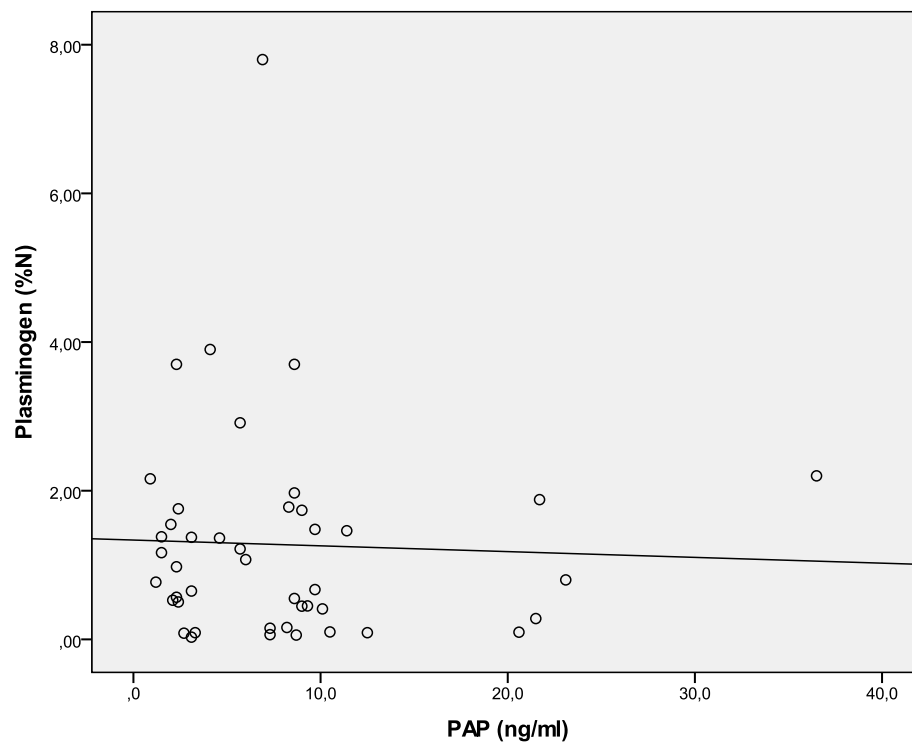
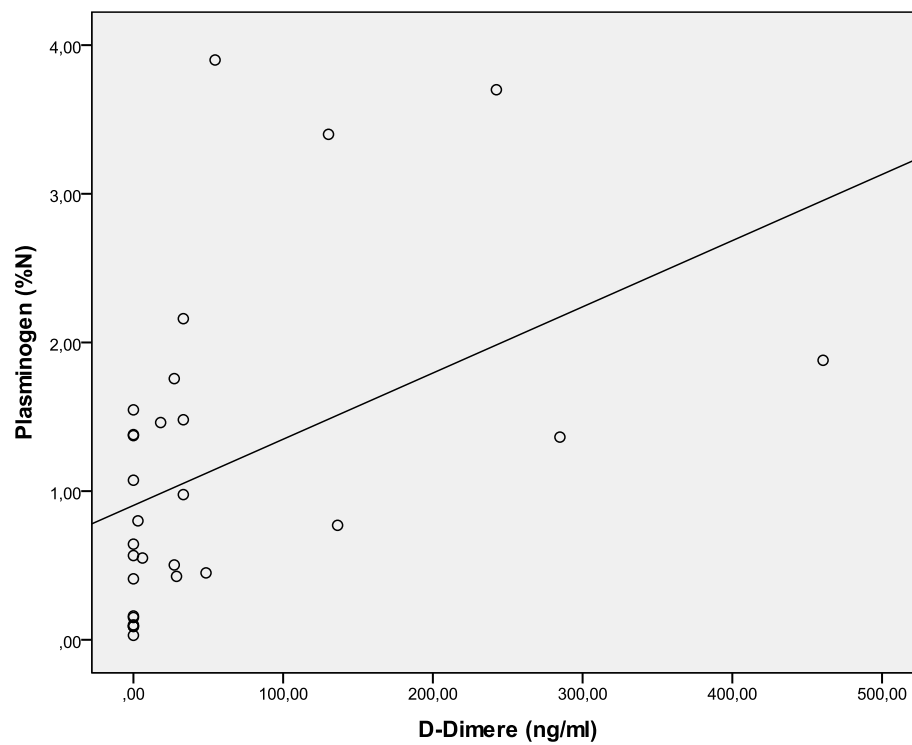


Abbildung 4.16: Korrelation zwischen Plasminogen und VEGF-A ( $r = 0,476$ ,  $p = 0,001$ , Spearman-Korrelation)

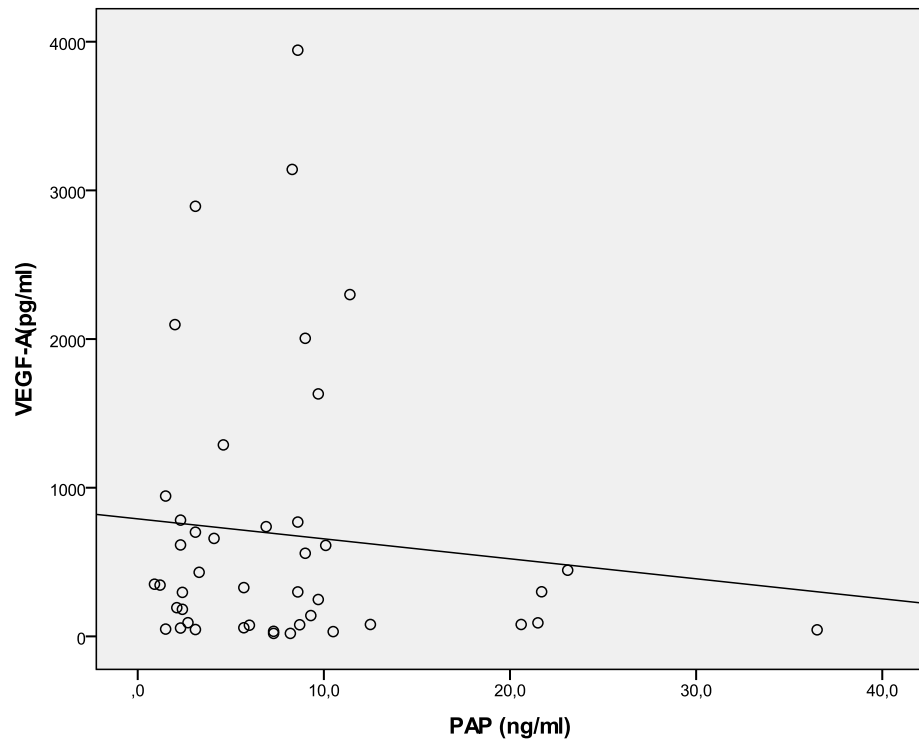




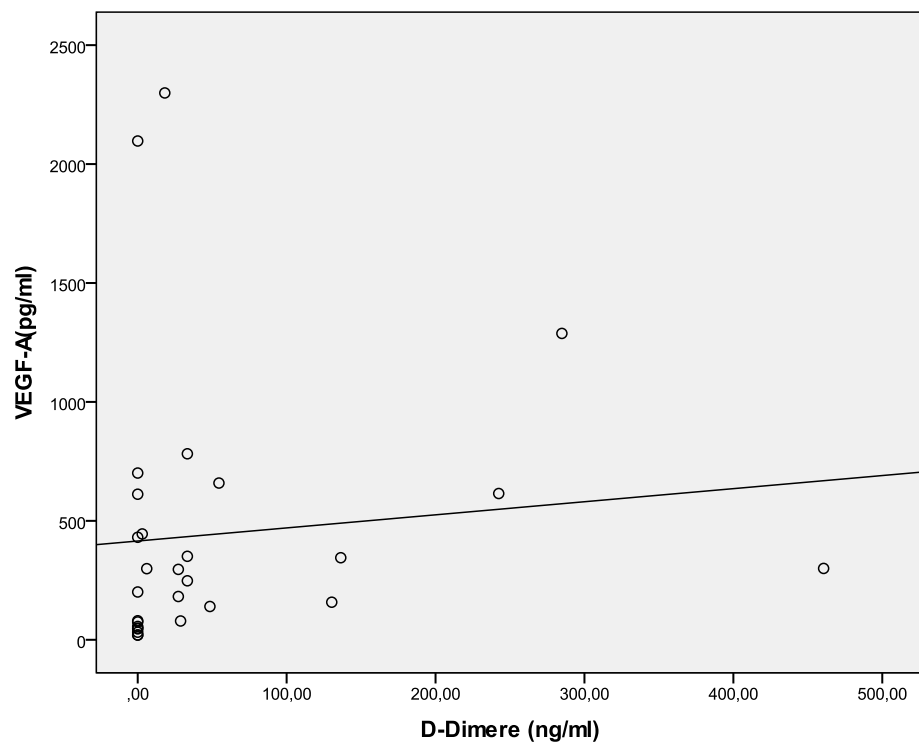
**Abbildung 4.17: Korrelation zwischen Plasminogen und PAP ( $r = -0,135$ ,  $p = 0,382$ , Spearman-Korrelation)**



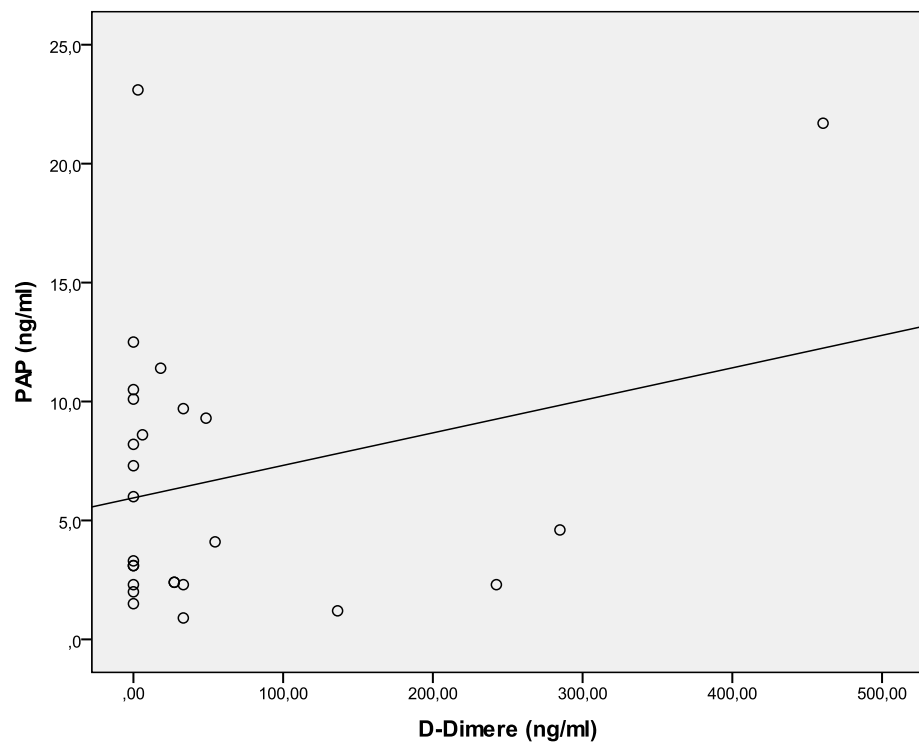
**Abbildung 4.18: Korrelation zwischen Plasminogen und D-Dimere ( $r = 0,583$ ,  $p = 0,01$ , Spearmann-Korrelation)**



**Abbildung 4.19: Korrelation zwischen VEGF-A und PAP ( $r = -0,103$ ,  $p = 0,506$ , Spearman-Korrelation)**



**Abbildung 4.20: Korrelation zwischen VEGF-A und D-Dimere ( $r = 0,398$ ,  $p = 0,032$ , Spearman-Korrelation)**



**Abbildung 4.21: Korrelation zwischen PAP und D-Dimere ( $r = -0,64$ ,  $p = 0,757$ , Spearman-Korrelation)**

Im Anhang der Arbeit sind die anonymisierten Daten der Studie 2012 beigefügt.

## **5. Diskussion**

### **5.1. Methodenkritik**

#### **5.1.1. Studie 2010**

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Studie 2010 fällt schnell die geringe Fallzahl an Patienten mit retinalem Gefäßverschluss auf. Dies ist auf die Ergebnisse der Vorgängerstudie (Spychalska 2013, Bertelmann et al. 2013) und auf unveröffentlichte Daten weniger Glaskörperproben zurückzuführen, nach denen die Methode neu überdacht und geändert wurde. Nach interner Evaluation und Diskussion wurde eine andere Nachweismethode mit deutlich geänderter Aufbereitung der Proben gewählt (Argininpufferung, Albuminzugabe, schnellere Gefrierung). Die Methoden waren aus unserer Sicht nicht vergleichbar, sodass die Studie 2012 entworfen wurde.

Eine Fehlerquelle kann die Untersuchung von Vorderkammerflüssigkeit zur Bestimmung von Komponenten des fibrinolytischen Systems sein. Bei der Gestaltung der Studie gingen wir von einer guten Korrelation der Konzentrationen der jeweiligen Komponenten in Glaskörperflüssigkeit und Vorderkammerwasser aus (Noma et al. 2010). Nach unseren Daten nehmen wir einen deutlichen Verdünnungseffekt vom hinteren zum vorderen Augenabschnitt an und erreichen im Kammerwasser sehr niedrige Konzentrationen, welche keine signifikanten Steigerungen bei Patienten mit Störungen der Blut-Retina-Schranke aufzeigten (Bertelmann et al. 2013). Weitere Studien zeigen ein widersprüchliches Bild der Korrelation zwischen den Ergebnissen von Kammerwasser- und Glaskörperproben (Noma et al. 2008; Ecker et al. 2011).

Der D-Dimer ELISA hat eine untere Nachweisgrenze von 0,17 mg/l. Da alle Bestimmungen nur die untere Nachweisgrenze gezeigt haben, muss die tatsächliche Konzentration unter 0,17 mg/l sein. Sensitivere Testsysteme könnten die Analyse verbessern. Die Auswertung von nur elf Glaskörperproben kann keine statistische Signifikanz herleiten.

Das Verfahren der Kammerwasserentnahme kann als sicher bezeichnet werden, auch wenn nicht immer ausreichend Volumen gewonnen werden kann (Bertelmann et al. 2012).

### **5.1.2. Studie 2012**

Für die Vergleichbarkeit ist die bei dieser Studie durchgeführte core-Vitrektomie ein gutes Verfahren, um die intraokulare Variabilität der Zytokine in der Bewertung zu berücksichtigen (Shimada et al. 2009). Die Methode der core-Vitrektomie hatte keine unerwünschten Effekte und kann als sicher bewertet werden (vgl. Schramm et al. 2014).

Bei der Verarbeitung der Glaskörperproben ergab sich ein Zeitfenster von ca. drei Minuten von der operativen Entnahme bis zur Stabilisierung und Gefrierung, sodass zeitkritische Parameter dadurch verfälscht sein könnten. Nach dem Einfrieren auf -80°C sind die Konzentrationen der Zytokine für mindestens sechs Monate stabil (Koss et al. 2011), in unserer Studie konnte jedoch bei mangelnder Verfügbarkeit eines entsprechenden Gefriergerätes nur eine Lagerung bei -20°C erfolgen. Diese Methode wurde in allen Studiengruppen angewendet, sodass wir bei einem möglichen systematischen Fehler ähnliche Konzentrationsveränderungen in allen Studiengruppen gleichermaßen erwarten. Ferner konnte keine vergleichende Studie zu den unterschiedlichen Lagerungsbedingungen in der Literaturrecherche die Auswirkungen beschreiben.

Wir gaben zu den Glaskörperproben Arginin und Albumin. Arginin unterbricht zuverlässig jegliche fibrinolytische Aktivität und damit Veränderungen der Konzentration aufgrund enzymatischer Aktivität (Stief 2012). Albumin ist ein relativ großes Protein (580-590 Aminosäuren, Molekulargewicht ca. 67 kDa) (Koolmann et al. 2003) und verhindert, dass sich kleine Proteine, wie die Komponenten des fibrinolytischen Systems, mit dem Kunststoff (Polypropylen) der Eppendorf®-Gefäße verbinden. Es entsteht ein Proteinüberschuss und es gehen nun am ehesten die Albuminmoleküle die Oberflächenbindung ein (Stief 2012).

Die Studie 2010 nutzte noch die Standard Plasminogenanalyseverfahren, die vor allem auf die Konzentration im Blutplasma ausgelegt sind (Bertelmann et al. 2013). In der Studie 2012 nutzten wir ein innovatives, speziell zu diesem Zweck entwickeltes, Verfahren, welches deutlich sensitiver ist. Es können damit weniger als 0,1% der Norm nachgewiesen werden (Stief 2013). Im Glaskörper stellten wir erstmals eine deutlich

geringere Plasminogenaktivität als im Blutplasma fest, sodass dieses neue Testkit für alle weiteren Forschungsprojekte in der Zukunft angewendet werden sollte.

Der Nachweis der Konzentration oder der Aktivität von VEGF-A, des Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin-Komplexes und der D-Dimere gelang auch zuverlässig. Es konnten höhere D-Dimer-Konzentrationen als in der Vorgängerstudie nachgewiesen werden. Grund dafür könnte der geänderte Testkit, die Probenaufbereitung oder die andere Entnahmetechnik (cppV) sein. Kritisch muss die häufige Nicht-Bestimmung der D-Dimere angemerkt werden.

## **5.2. Ergebnisse**

Bei der Interpretation der Ergebnisse spielte die Herkunft der Fibrinolysefaktoren eine große Rolle. Es ist vorstellbar, dass sie intraokulär produziert oder freigesetzt wurden, aber dies ist bisher nicht beschrieben worden. Da jedoch die Faktoren im Glaskörper (und teilweise auch im Kammerwasser) nachzuweisen waren und auch bei intakter Blut-Retina Schranke (BRS) der Prozess der Fibrinolyse nachweisbar war (Bertelmann et al. 2014), müsste durch die intakte BRS eine Diffusion oder ein aktiver Transport der Proteine erfolgen.

In Augen mit einer RVO, aber auch bei AMD oder diabetischer Retinopathie, liegt häufig ein Makulaödem und damit eine Störung der BRS vor (Miyake et al. 1992, Scholl et al. 2010, Noma et al. 2008, Noma et al. 2010). Erhöhte intravitreale Konzentrationen der Zytokine IL-6 und VEGF wurden dokumentiert und zeigen eine BRS Störung an bzw. korrelieren mit dieser (Noma et al. 2008, Noma et al. 2010). Die Annahme liegt nahe, bei gestörter BRS auch Faktoren der Fibrinolyse vermehrt in den Glaskörper übertreten können.

Die Ergebnisse der Studie 2012 zeigen, neben der bereits beschriebenen erhöhten VEGF-Konzentration, signifikant höhere Plasminogenkonzentrationen in Augen mit Zentralvenen- und Venenastverschluss im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit intakter BRS.

Die höchsten Plasminogenaktivitäten konnten in der ZVV-Gruppe, gefolgt von der VAV-Gruppe nachgewiesen werden. Am geringsten waren sie in der Kontrollgruppe. Die

gleiche Rangfolge der Studiengruppen zeigt die Verteilung der VEGF-Konzentrationen (am meisten in der ZVV-Gruppe, am wenigsten in der Kontrollgruppe) und bietet damit das gleiche Ergebnis wie bisherige Studien (Koss et al. 2007).

Noma und Kollegen wiesen bereits die Korrelation der VEGF-Konzentration mit dem Ausmaß des Makulaödems und damit mit der Schwere der Blut-Retina-Schrankenstörung nach (Noma et al. 2008, Noma et al. 2010). Wir konnten eine signifikante positive Korrelation der Konzentration des Plasminogen mit der Konzentration des VEGF nachweisen, sodass wir annehmen, dass die Schwere der BRS-Störung einen direkten Einfluss auf die Plasminogenaktivität hat.

Bei höherer Plasminogenaktivität erwarten wir auch höhere Konzentrationen des Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin-Komplexes. Zu Plasmin aktiviertes Plasminogen wird nach der Reaktion im PAP gebunden. Dies konnten wir nicht nachweisen. Die Bestimmung und Auswertung der weiteren Faktoren der Fibrinolyse, wie zum Beispiel das  $\alpha$ 2-Antiplasmin, könnte in weiteren Studien dieses Ergebnis weiter erklären (siehe Abbildung 2.1).

Die D-Dimere sind Spaltprodukte des Fibrins (Koolman et al. 2003). Der Nachweis der Spaltprodukte stellt einen Nachweis der Fibrinolyse dar. Wir konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studiengruppen finden. Da die D-Dimere recht selten bestimmt wurden, könnte eine zu geringe Fallzahl ursächlich sein (siehe Tabelle 4.12) oder weitere, bisher unbekannte und nicht evaluierte Confounder eine Rolle spielen.

### **5.3. Klinische Relevanz**

Erstmals gelang mit der neuartigen Methode der intraokuläre Plasminogennachweis bei Patienten mit ZVV und VAV. Plasminogen ist für die Wirkung von rt-PA notwendig. Plasminogen wird im Rahmen der enzymatischen Vitreolyse genutzt, sie wird durch rt-PA in die aktive Serinprotease Plasmin überführt. Diese Serinprotease spaltet schließlich Verbindungsmoleküle des vitreomakulären Interface und ist damit der zentrale Vorgang für die Induktion einer hinteren Glaskörperabhebung (Hesse et al. 2000, Bertelmann et al. 2013, Marder 2011, Uemera et al. 2005). Eine erhöhte

Plasminogenkonzentration bei Patienten mit BRS-Störung begünstigt also die lokale Pharmakodynamik bei intravitrealer Injektion.

Es gibt bereits erste positive Ergebnisse einer pharmakologischen Vitreolyse mit rt-PA (Hesse et al. 2000). Eine Studie mit kleiner Fallzahl zeigte eine Erfolgswahrscheinlichkeit von 76% eine PVD zu induzieren (Murakami et al. 2007). Die Ablösung der hinteren Grenzschicht des Glaskörpers von der ILM ist ein wirksames Verfahren zur Vermeidung von Komplikationen der Neovaskularisation mit positiver Auswirkung auf die Visusprognose (Hikichi et al. 1995, Takashi et al. 1997, Murakami et al. 2007). Eine medikamentöse Methode vermied die Risiken der operativen Vitrektomie. Unser Ergebnis scheint diesen Ansatz zu bestätigen.

Die Therapie mit Anti-VEGF, rt-PA und operativer Vitrektomie wurde bei Patienten mit Venenastverschluss bereits verglichen. Auch hier zeigt sich eine gute Wirksamkeit (gleichwertig mit der des Anti-VEGF) von rt-PA (Kumagai et. al 2012).

Diese Studie zeigt erstmals das Vorkommen von erhöhten Konzentrationen der Komponenten des fibrinolytischen Systems in Augen mit RVO. Dadurch lässt sie die Therapie mit intravitreal applizierten rt-PA begründen und rechtfertigen. Zur Evaluation der rt-PA-Behandlung sind größere, prospektiv randomisierte Studien mit ausreichender Fallzahl erforderlich. Weitere Kenntnisse des intraokulären Fibrinolysesystems und ihrer Komponenten könnten weitere pharmakologische Ansatzpunkte hervorbringen.



## Literaturverzeichnis

- (1) Aiello LP, Avery RL, Arrig PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, Pasquale LR, Thieme H, Iwamoto MA, Park JE, et al.; Vascular endothelial growth factor on ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders; *N Engl J Med*. 1994; 331:1480-7
- (2) Bertelmann T, Bertelmann I, Szurman P, Mester U, Schmidt J, Sekundo W, Mennel S; Vitreous body and retinal vein occlusion; *Ophthalmologe* 2014; 111:1178-82
- (3) Bertelmann T, Stief T, Bölöni R, Schule S, Wenner Y, Sekundo W, Mennel S; Fibrinolysis in normal vitreous liquid; *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014; 25:217-20
- (4) Bertelmann T, Spychalska M, Kohlberger L, Strodthoff S, Witteborn M, Kicova N, Sachs U, Irle S, Mennel S; Intracameral concentrations of the fibrinolytic system components in patients with age-related macular degeneration; *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013; 251:2697-704
- (5) Bertelmann T, Kičová N, Kohlberger L, Spychalska M, Strodthoff S, Irle S, Mennel S; Sampling aqueous humor: anterior segment anatomy, anesthetic and surgical technique, and rates of yield; *Ophthalmic Res*. 2012;47:213-9
- (6) Bertelmann T, Kičová N, Messerschmidt-Roth A, Irle S, Sekundo W, Mennel S; The vitreomacular interface in retinal vein occlusion; *Acta Ophthalmol* 2011; 89:e327-31
- (7) Branch Vein Occlusion Study Group; Argon laser scatter photocoagulation for prevention of neovascularization and vitreous hemorrhage in branch vein occlusion. A randomized clinical trial; *Arch Ophthalmol* 1986; 104:34–41
- (8) Brown DM, campochiaro PA, Singh RP, Li Z, Gray S, Sarof N, Rundle AC, Rubio RG, Murahashi WY, CRUISE Investigators; Ranibizumab for macular edema following central retinal vein occlusion: six month primary end point results of a phase III study; *Ophthalmology* 2010; 117:1124-33
- (9) Chuo JY, Lee TY, Hollands H, Morris AH, Reyes RC, Rossiter JD, Meredith SP, Maberley DA; Risk factors for posterior vitreous detachment: a case-control study; *Am J Ophthalmol* 2006; 142:931-7

- (10) De Smet MD, Gandorfer A, Stalmans P, Veckeneer M, Feron E, Pakola S, Kampik A; Microplasmin intravitreal administration in patients with vitreomacular traction scheduled for vitrectomy: the MIVI I trial; *Ophthalmology* 2009; 116:1349-55
- (11) Dörner K; Taschenbuch klinische Chemie und Hämatologie; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 8. Auflage; 2013
- (12) Duker JS, Brown GC; Anterior location of the crossing artery in branch retinal vein obstruction; *Arch Ophthalmol* 1989 Jul; 107:998-1000
- (13) Ecker SM, Hines JC, Pfahler SM, Glaser BM; Aqueous cytokine and growth factor levels do not reliably reflect those levels found in the vitreous; *Mol Vis* 2011; 17:2856-63
- (14) Engvall E, Perlmann P; Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G; *Immunochemistry* 1971; 8:871-4
- (15) Fachinformation Avastin 25mg/ml. Stand: November 2014. Roche Registration Limited, Welwyn Garden City, Vereinigtes Königreich.  
Zulassungsnummer: EU/1/04/300/001
- (16) Fachinformation Eylea 40 mg/ml. Stand: Februar 2015. Bayer Pharma AG, Berlin. Zulassungsnummer: EU/1/12/797/002
- (17) Fachinformation Lucentis 10 mg/ml. Stand: November 2014. Novartis Europharm Limited, Camberley, Vereinigtes Königreich.  
Zulassungsnummer: EU/1/06/374/003
- (18) Fachinformation Macugen 0,3 mg. Stand: August 2012. Pfizer Limited, Sandwich, Kent, Vereinigtes Königreich.  
Zulassungsnummer: EU/1/05/325/002
- (19) Geck U, Pustolla N, Baraki H, Atili A, Feltgen N, Hoerauf H; Posterior vitreous detachment following intravitreal drug injection; *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013; 251:1691-5
- (20) Glacet-Bernard A, Zourdani A, Milhoub M, Maraqua N, Coscas G, Soubrane G; Effect of isovolemic hemodilution in central retinal vein occlusion; *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2001; 239:909-14

- (21) Green WR, Chan CC, Hutchins GM, Terry JM; Central retinal vein occlusion: a prospective histopathologic study of 29 eyes in 28 cases; *Retina* 1981; 1:27-55
- (22) Haller JA, Bandello F, Belfort R Jr, Blumenkranz MS, Gillies M, Heier J, Loewenstein A, Yoon YH, Jiao J, Li XY, Whitcup SM; Ozurdex GENEVA Study Group, Li J; Dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema related to branch or central retinal vein occlusion twelve-month study results; *Ophthalmology* 2011; 118:2453-60
- (23) Håkansson G, Gesslein B, Gustafsson L, Englund-Johansson U, Malmström M; Hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor in the neuroretina and retinal blood vessels after retinal ischemia; *J Ocul Bio Dis Infor.* 2010; 3:20-29
- (24) Haller JA, Bandello F, Belfort R Jr, Blumenkranz MS, Gillies M, Heier J, Loewenstein A, Yoon YH, Jacques ML, Jiao J, Li XY, Whitcup SM; Ozurdex GENEVA Study Group; Randomized, sham-controlled trial of dexamethasone intravitreal implant in patients with macular edema due to retinal vein occlusion; *Ophthalmology* 2010; 117:1134-46
- (25) Haller JA, Stalmans P, Benz MS, Gandorfer A, Pakola SJ, Girach A, Kampik A, Jaffe GJ, Toth CA, MIVI-TRUST Study Group; Efficacy of intravitreal ocriplasmin for treatment of vitreomacular adhesion: subgroup analyses from two randomized trials; *Ophthalmology* 2015; 122:117-22
- (26) Hayreh SS; Management of Central Retinal Vein Occlusion; *Ophthalmologica* 2003; 217:167-88
- (27) Hayreh SS, Zimmerman MB, Podhajsky P; Incidence of various types of retinal vein occlusion and their recurrence and demographic characteristics; *Am J Ophthalmol* 1994; 117:429-41
- (28) Hesse L, Nebeling B, Schroeder B, Heller G, Kroll P; Induction of Posterior Vitreous Detachment in Rabbits by Intravitreal Injection of Tissue Plasminogen Activator Following Cryopexy; *Exp. Eye Res.* 2000; 70:31-9
- (29) Hikichi T, Koda M, Yoshida A; Intravitreal injection of hyaluronidase cannot induce posterior vitreous detachment in rabbit; *Retina* 2000; 20:195-8

- (30) Hikichi T, Yanafiya N, Koda M, Akiba J, Yoshida A; Posterior vitreous detachment induced by injection of plasmin and sulfur hexafluoride in the rabbit vitreous; *Retina* 1999; 19:55-8
- (31) Hikichi T, Akiba J, Trempe CL; Prevalence of posterior vitreous detachment in retinitis pigmentosa; *Ophthalmic Surg* 1995; 26:34-8
- (32) Hikichi T, Konno S, Trempe CL; Role of the vitreous in central retinal vein occlusion; *Retina* 1995; 15:29-3
- (33) Hoerauf H, Feltgen N, Bartz-Schmidt KU, Bertram B, Bornfeld N, Hansen LL, Heimann H, Helbig H, Kampik A, Kirchhof B, Lemmen KD, Pauleikhoff D, Roeder J; Statement of the German Ophthalmological Society, the Retinological Society and the Professional Association of German Ophthalmologists on Therapy for Macular Oedema in Cases of Retinal Vein Occlusion; *Klin Monbl Augenheilkd.* 2010; 227:542-56
- (34) Ip MS, Scott IU, VanVeldhuisen PC, Olden NL, Blodi BA, Fisher M, Singerman LJ, Tolentino M, Chan CK, Gonzalez VH; SCORE Study Research Group; A randomized trial comparing the efficacy and safety of intravitreal triamcinolone with observation to treat vision loss associated with macular edema secondary to central vitreal vein occlusion: the Standard Care vs. Corticosteroid for Retinal Vein Occlusion (SCORE) study report 5; *Arch Ophthalmol.* 2009; 127:1101-14
- (35) Koch FH, Koss MH; Microincision Vitrectomy Procedure Using Intreacor Technology; *Arch Ophthalmol* 2011; 129:1599-604
- (36) Koss MJ, Pfister M, Koch FH; Inflammatory and angionenic protein detection in the human vitreous: cytometric bead assay; *J Ophthalmol.* 2011; 2011:459251
- (37) Krebs I, Brannath W, Glittenberg C, Zeiler F, Sebag J, Binder S; Posterior Vitreomacular Adhesion: A Potential Risk Factor for Exsudative Age-related Macular Degeneration?; *Am J Ophthalmol* 2007; 144:741-46
- (38) Kumagai K, Ogino N, Furukawa M, Larson E; Three treatments for macular edema because of branch retinal vein occlusion: intravitreal bevacizumab or tissue plasminogen activator, and vitrectomy; *Retina* 2012; 32:520-9

- (39) Kohno T, Sorgente, N, Ishibashi T, Goodnight R, Ryan S; Immunofluorescent Studies of Fibronectin and Laminin in the Human Eye; *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987; 28:506-514
- (40) Kolar P; Risk Factors for Central and Branch Retinal Vein Occlusion: A Meta-Analysis of Published Clinical Data; *J Ophthalmol* 2014; 2014:724780
- (41) Koolman J, Röhm KH; Taschenatlas der Biochemie; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 3. Auflage; 2003
- (42) Koss MJ, Naser H, Sener A, Ackermann H, Al-Sarireh F, Singh P, Koch FH; Combination therapy in diabetic macular oedema and retinal vein occlusion – past and present; *Acta Ophthalmol* 2012; 90:580-9
- (43) Kroll P, Küchle M, Küchle HJ (Hrsg.); Augenärztliche Untersuchungsmethoden; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 3. Auflage; 2007
- (44) Lang GK, Gareis O, Lang GE, Recker D, Spraul CW, Wagner P; Augenheilkunde; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 4. Auflage; 2008
- (45) Le Mer Y, Kroll P, Chofflet J, Hesse L; Recherche systématique du cortex vitrèen posterior lors de la vitrectomie; *J Fr Ophthalmol* 1994; 17:459-64
- (46) Liebreich R; Ophthalmoskopische Notizen: Über die Farbe des Augengrundes; *Albrecht Von Graefe Arch Ophthalmol* 1855; 1:333-56
- (47) Machemer R, Buettner H, Norton EW, Parel JM; Vitrectomy: a pars plana approach. *Trans Am Acas Ophthalmol Otolaryngol* 1971; 75:813-20
- (48) Marder VJ; Historical perspective and future direction of thrombolysis research: the red-discovery of plasmin; *J Thromb Haemost* 2011; 9(Suppl 1):364-73
- (49) McAllister IL; Central retinal vein occlusion: a review; *Clin Experiment Ophthalmol*. 2012; 40:48-58
- (50) McChannel CA, Nordlund JR, Bacon D, Robertson DM; Perioperativ morbidity and mortality associated with vitreoretinal and ocular oncologic surgery performed under general anesthesia; *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003; 101:209-13

- (51) McIntosh RL, Rogers SL, Lim L, Cheung N, Wang JJ, Mitchell P, Kowalski JW, Nguyen HP, Wong TY; Natural history of central natural vein occlusion: an evidence-based systematic review; *Ophthalmology* 2010; 117:1113-23
- (52) Miyake K, Miyake T, Kayazawa F; Bloodaqueous barrier in eyes with retinal vein occlusion; *Ophthalmology* 1992; 99:906-10
- (53) Morita H, Funata M, Tokoro T; A clinical study of the development of posterior vitreous detachment in high myopia; *Retina* 1995; 15:117-24
- (54) Michel J; Die spontane Thrombose der Vena centralis des opticus; *Albrecht Von Graefe Arch Ophthalmol* 1878; Bd. XXIV, 2. S. 37
- (55) Murakami T, Takagi H, Kita M, Nishiwaki H, Miyamoto K, Ohashi H, Watanabe D, Yoshimura N; Intravitreal Tissue Plasminogen Activator to Treat Macular Edema Associated With Branch Retinal Vein Occlusion; *Am J Ophthalmol* 2006; 142:318-20
- (56) Murakami T, Takagi H, Ohashi H, Kita M, Nishiwaki H, Miyamoto K, Watanabe D, Sakamoto A, Yamaike N, Yoshimura N; Role of posterior vitreous detachment induced by intravitreal tissue plasminogen activator in macular edema with central retinal vein occlusion; *Retina* 2007; 27:1031-7
- (57) Murdoch IE, Rosen PH, Shilling JS; Neovascular response in ischaemic central retinal vein occlusion after panretinal photocoagulation; *Br J Ophthalmol.* 1991; 75:459-61
- (58) Noma H, Funatsu H, Yamasaki M, Tsukamoto H, Mimura T, Sone T, Hirayama T, Tamura H, Yamashita H, Minamoto A, Mishima HK; Aqueous humour levels of cytokines are correlated to vitreous levels and severity of macular oedema in branch retinal vein occlusion; *Eye (Lond)* 2008; 22:42-8
- (59) Noma H, Funatsu H, Mimura T, Harino S, Hori S; Aqueous humor levels of vasoactive molecules correlate with vitreous levels and macular edema in central retinal vein occlusion; *Eur J Ophthalmol* 2010; 20:402-9
- (60) O'Malley C, Heintz RM sr.; Vitrectomy with an alternative instrument system; *Ann Ophthalmol.* 1975; 7:585-8, 591-4
- (61) Osterloh MD, Charles S; Surgical decompression of branch retinal vein occlusions; *Arch Ophthalmol* 1988; 106:1469-71

- (62) Pape HC, Kurtz A, Silbernagl S; Physiologie; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 7. Auflage 2014
- (63) Rehak M, Wiedemann P; Retinal vein thrombosis: pathogenesis and management; *J Thromb Haemost* 2010; 8:1886-94
- (64) Rehm H (Hrsg.), Letzel T; Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics; Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 6. Auflage; 2010
- (65) Renz H (Hrsg.); Praktische Labordiagnostik: Ein Lehrbuch zur Laboratoriumsmedizin, klinischen Chemie und Hämatologie; Berlin, Boston: De Gruyter; 1. Auflage; 2009
- (66) Rogers S, McIntosh RL, Cheung L, et al; The prevalence of retinal vein occlusion: pooled data from population studies from the United States, Europe, Asia, and Australia; *Ophthalmology* 2010; 117:313-9
- (67) Rosenfeld PJ, Fung AE, Puliafito CA; Optical coherence tomography findings after an intravitreal injection of bevacizumab (avastin) for macular edema from central retinal vein occlusion; *Ophthalmic Surg Lasers Imaging*. 2005; 36:336-9
- (68) Ryu CL, Elfersy A, Desai U, Hessburg T, Edwards P, Gao H; The effect of anti-vascular endothelial growth factor therapy on the development of neovascular glaucoma after central retinal vein occlusion: a retrospective analysis; *J Ophthalmol*. 2014; 2014:317694
- (69) Schmidt JC, Mennel S; Untersuchung des Glaskörpers. In: Kroll P, Küchle M, Küchle HJ (Hrsg.); Augenärztliche Untersuchungsmethoden; Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 3. Auflage; 2007: 285-289
- (70) Scholl S, Kirchhof J, Augustin AJ; Pathophysiology of macular edema; *Ophthalmologica* 2010; 224(Suppl 1):8-15
- (71) Schramm K, Mueller M, Koch FH, Singh P, Kohnen T, Koss MJ; Effects of core vitrectomy in the treatment of age-related macular degeneration; *Acta Ophthalmol*. 2014; 92:465-72
- (72) Schumann JS; Spectral domain optical coherence tomography for glaucoma; *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2008; 106:426-58

- (73) Shen Z, Duan X, Wang F, Wang N, Peng Y, Liu DTL, Peng X, Li S, Liang Y; Prevalence and risk factors of posterior vitreous detachment in a Chinese adult population: the Handan eye study; *BMC Ophthalmology* 2013; 13:33
- (74) Shimada H, Akaza E, Yuzawa M, Kawashima M; Concentration gradient of vascular endothelial growth factor in the vitreous of eyes with diabetic macular edema; *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009; 50:2953-5
- (75) Singer M, Tan CS, Bell D, Sadda SR; Area of peripheral retinal nonperfusion and treatment response in branch and central retinal vein occlusion; *Retina* 2014; 34:1736-42
- (76) Spychalska M, Pilotstudie zur intrakameralen und plasmatischen Konzentrationsbestimmung der Fibrinolysefaktoren bei der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), Dissertation Marburg 2013
- (77) Squizzato A, Manfredi E, Bozzato S, Dentali F, Ageno W; Antithrombotic and fibrinolytic drugs for retinal vein occlusion: a systemic review and a call for action; *Thromb Haemost.* 2010; 103:271-6
- (78) Stalmans P, Delaey C, de Smet MD, van Dijkman E, Pakola S; Intravitreal injection of microplasmin for treatment of vitreomacular adhesion: results of a prospective, randomized, sham-controlled phase II trial (the MIVI IIT trial); *Retina* 2010; 30:1122-7
- (79) Stalmans P, Benz MS, Gandorfer A, Kampik A, Girach A, Pakola S, Haller JA; MIVI-TRUST Study Group; Enzymatic vitreolysis with ocriplasmin for vitreomacular traction and macular holes; *N Engl J Med.* 2012; 367:606-15
- (80) Stief TW (Hrsg.); Thrombin - applied clinical biochemistry of the main factor of coagulation; New York: Nova science publishers; 2012
- (81) Stief TW; A functional plasminogen assay in clinical samples containing less than 1% of the normal plasma concentration; *Hemost Lab* 2013; 6:351-55
- (82) Tachi N, Hashimoto Y, Ogino N; Vitrectomy for macular edema combined with retinal vein occlusion; *Doc Ophthalmol* 1999; 97:465-9
- (83) Takahashi MK, Hikichi T, Akiba J, Yoshida A, Trempe CL; Role of the vitreous and macular edema in branch retinal vein occlusion; *Ophthalmic Surg Lasers* 1997; 28:294-9



- (84) Thach AB, Yau L, Hoang C, Tuomi L; Time to clinically significant visual acuity gains after ranibizumab treatment for retinal vein occlusion: BRAVO and CRUISE trials; *Ophthalmology* 2014; 121:1059-66
- (85) Uemura A, Nakamura M, Kachi S, Nishizawa Y, Asami T, Miyake Y, Terasaki H; Effect of plasmin on laminin and fibronectin during plasmin-assisted vitrectomy; *Arch Ophthalmol* 2005; 123:209-13
- (86) Vanders J, Kleiner R; A method for induction of posterior vitreous detachment during vitrectomy; *Retina* 1992; 12:172-3
- (87) Van Weemen BK, Schuurs AH; Immunoassay using antigen-enzyme conjugates; *FEBS Lett.* 1971; 15:232-6
- (88) Wesemann W, Schiefer U, Bach M; Neue DIN-Normen zur Sehschärfebestimmung; *Ophthalmologe* 2010; 107:821-6
- (89) Yamamoto S, Saito W, Yagi F, Takeuchi S, Sato E, Mizunoya S; Vitrectomy With or Without Arteriovenous Adventitial Sheathotomy für Macular Edema Associated with Branch Retinal Vein Occlusion; *Am J Ophthalmol* 2004; 138:907-14
- (90) Yeh S, Kim SJ, Ho AC, Schoenberger SD, Bakri SJ, Ehlers JP, Thorne JE; Therapies for Macular Edema Associated with Central Retinal Vein Occlusion; *Ophthalmology* 2015; 122:769-78
- (91) Zegarra H, Gutman FA, Conforto J; The natural course of central retinal vein occlusion; *Ophthalmology* 1979; 86:1931-42

# **Tabellen- und Abbildungsverzeichnis**

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 2.1: Klassifikation der retinalen Gefäßverschlüsse	10
Tabelle 3.1: Umrechnung der klinischen Sehschärfe in Dezimale	23
Tabelle 4.1: Epidemiologische Maßzahlen der Studie 2010	33
Tabelle 4.2: Visus und zentrale Makuladicke in den verschiedenen Studiengruppen (Studie 2010)	34
Tabelle 4.3: Glaskörperstatus in den verschiedenen Studiengruppen (Studie 2010)	35
Tabelle 4.4: Fibrinolytika in den Studiengruppen (Kammerwasser) (Studie 2010)	37
Tabelle 4.5: Fibrinolytika in den Studiengruppen (Glaskörper) (Studie 2010)	39
Tabelle 4.6: Epidemiologische Maßzahlen der Studie 2012	42
Tabelle 4.7: Visus und CMT in den verschiedenen Studiengruppen (Studie 2012)	42
Tabelle 4.8: Ergebnisse der Fundusphotographie (Studie 2012)	44
Tabelle 4.9: Ergebnisse der FAG (Studie 2012)	44
Tabelle 4.10: Konzentrationen der Fibrinolytika (Studie 2012)	45
Tabelle 4.11: Spearman-Korrelation und Signifikanz (zweiseitig)	48
Tabelle 4.12: Rohdaten der Studie 2012	71-73
Tabelle 4.13: Erkrankungen der Kontrollgruppe (Studie 2012)	74

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 2.1: Darstellung der Regulation der Fibrinolyse	14
Abbildung 3.1: Schallkopforientierung der transversalen Schnittbilder	19
Abbildung 3.2: Schallkopforientierung der longitudinalen Schnittbilder	19
Abbildung 3.3: Sonographie des linken Bulbus in transversaler Schallkopforientierung (Augenklinik Marburg)	20
Abbildung 3.4: OCT (Programm Crossline) mit Darstellung eines zystoiden Makulaödems (Augenklinik Marburg)	21
Abbildung 3.5: OCT (Programm Crossline) mit Darstellung eines Normalbefundes (Augenklinik Marburg)	21
Abbildung 3.6: OCT (Programm EMM-5) mit Darstellung des zystoiden Makulaödems in zwei Ebenen und Errechnung der zentralen Makuladicke (CMT) (Augenklinik Marburg)	22
Abbildung 3.7: Fundusphoto eines Patienten mit Venenastverschluss (Augenklinik Marburg)	22
Abbildung 4.1: Boxplot Diagramm der CMT (Studie 2010)	34
Abbildung 4.2: Boxplot Diagramm des Visus (Studie 2010)	35
Abbildung 4.3: Boxplot-Diagramm des Plasminogen im Kammerwasser (Studie 2010)	37
Abbildung 4.4: Boxplot des $\alpha$ -2-Antiplasmin im Kammerwasser (Studie 2010)	38
Abbildung 4.5: Boxplot des Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasminkomplex im Kammerwasser (Studie 2010)	38
Abbildung 4.6: Boxplot des Plasminogen im Glaskörper (Studie 2010)	40
Abbildung 4.7: Boxplot des $\alpha$ 2-Antiplasmin im Glaskörper (Studie 2010)	40

Abbildung 4.8: Boxplot der D-Dimere im Glaskörper (Studie 2010)	41
Abbildung 4.9: Boxplot des PAP im Glaskörper (Studie 2010)	41
Abbildung 4.10: Boxplot-Diagramm der CMT (Studie 2012)	43
Abbildung 4.11: Boxplot-Diagramm des Visus (BCVA) (Studie 2012)	43
Abbildung 4.12: Boxplot-Diagramm Plasminogen (Studie 2012)	46
Abbildung 4.13: Boxplot-Diagramm VEGF-A (Studie 2012)	46
Abbildung 4.14: Boxplot-Diagramm PAP (Studie 2012)	47
Abbildung 4.15: Boxplot-Diagramm der D-Dimere (Studie 2012)	47
Abbildung 4.16: Korrelation zwischen Plasminogen und VEGF-A (Studie 2012)	48
Abbildung 4.17: Korrelation zwischen Plasminogen und PAP (Studie 2012)	49
Abbildung 4.18: Korrelation zwischen Plasminogen und D-Dimere (Studie 2012)	49
Abbildung 4.19: Korrelation zwischen VEGF-A und PAP (Studie 2012)	50
Abbildung 4.20: Korrelation zwischen VEGF-A und D-Dimere (Studie 2012)	50
Abbildung 4.21: Korrelation zwischen PAP und D-Dimere (Studie 2012)	51

## **Abkürzungsverzeichnis**

AMD	altersbedingte Makuladegeneration
BCVA	best corrected visual acuity (Bestkorrigierter Fernvisus)
BRB	Blood-retinal-barrier (Blut-Retina-Schranke)
BRS	Blut-Retina-Schranke
CME	cystoid macular edema (zystoides Makulaödem)
CMT	Zentrale Makuladicke
cppV	core pars plana vitrectomy
CRF	Case-Report-Form
CRP	C-Reaktives Protein
dpt	Dioptrie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FAG	Fluoreszenzangiographie
GCP	Good Clinical Practice
Hemi-ZVV	Hemizentralvenenverschluss
IL-6	Interleukin 6
ILM	Lamina limitans interna
OCT	Optische Kohärenztomographie
OD	Oculus dexter (rechtes Auge)
OS	Oculus sinister (linkes Auge)
PAI	Plasminaktivator Inhibitor
PAP	Plasmin- $\alpha$ 2-Antiplasmin Komplex

PD	Papillendurchmesser
ppV	Pars-plana-Vitrektomie
PVC	Posterior vitreous cortex (hintere Glaskörpergrenzschicht)
PVD	Posterior vitreous detachment (hintere Glaskörperabhebung)
RPE	Retinales Pigmentepithel
rt-PA	recombinant tissue-type plasminogen activator
RVO	retinal vein occlusion (Retinaler Gefäßverschluss)
SD-OCT	Spektral Domänen optische Kohärenztomographie
VAV	Venenastverschluss
VEGF	vascular endothelial growth factor
VMT	Vitreomakuläres Traktionssyndrom
ZMÖ	Zystoides Makulaödem
ZVV	Zentralvenenverschluss

## Anhang: Daten der Studienpatienten „Studie 2012“

Nr.	Gruppe	Geschlecht	Alter	Visus	Plasminogen [%N]	VEGF-A [pg/ml]	PAP [ng/ml]	D-Dimere [ng/ml]	OCT [ $\mu$ m]	Foto	FAG
2	VAV	w	67	0,24	1,17	944	1,5		607	h	i
3	VAV	w	68	0,1	1,38	49	1,5	0,00	599	h	n.a.
4	Kontrolle	w	33		0,06	78	8,7				
5	ZVV	w	78	0,24	2,91	58	5,7		451	h	
8	VAV	w	69	0,3	0,15	20	7,3	0,00	248		ni
9	VAV	w	81	0,36	1,74	559	9		631	h	
12	VAV	w	86	0,24	1,48	248	9,7	33,33	330	h	n.a.
16	Kontrolle	m	41		0,06	34	7,3				
17	VAV	w	72	0,2	1,07	75	6,0	0,00	527	nh	i
18	ZVV	w	76	0,24	0,65	2893	3,1		511	h	i
20	VAV	w	80	0,3	0,53	193	2,1		540	nh	ni
22	ZVV	m	40	0,24	1,55	2097	2,0	0,00		h	
23	ZVV	m	59	0,3	0,64	201		0,00	353	h	
25	VAV	w	81	0,05	0,98	782	2,3	33,33	482	h	i
27	VAV	m	73	0,008	1,22	328	5,7		689	h	
28	VAV	m	67	0,2	0,45	2005	9		701	h	i
30	ZVV	m	60	0,12	1,88	300	21,7	460,61	298	h	n.a.
37	VAV	w	70	0,6	3,9	659	4,1	54,55	384	nh	n.a.
39	Kontrolle	w	72		0,08	92	2,7				

Nr.	Gruppe	Geschlecht	Alter	Visus	Plasminogen [%N]	VEGF-A [pg/ml]	PAP [ng/ml]	D-Dimere [ng/ml]	OCT [µm]	Foto	FAG
43	VAV	w	81	0,36	1,36	1288	4,6	284,85	533	h	i
65	ZVV	w	78	0,05	7,8	738	6,9		320	nh	ni
109	Kontrolle	m	73		0,5	182	2,4	27,27			
118	Kontrolle	w	66		0,09	431	3,3	0,00			
121	ZVV	w	52	0,008	1,46	2299	11,4	18,18	538	nh	i
124	VAV	m	51	0,05	0,67	1631	9,7		328	h	i
126	VAV	m	80	0,12	1,97	769	8,6		267	h	i
127	ZVV	w	84	0,3	0,55	299	8,6	6,06			
129	ZVV	m	76	0,5	3,7	3943	8,6		189	nh	ni
131	Kontrolle	m	51		0,1	80	20,6				
134	Kontrolle	w	66		2,2	44	36,5				
136	ZVV	w	70	0,12	1,78	3141	8,3			nh	i
142	ZVV	m	53	0,1	1,76	296	2,4	27,27	430	nh	i
143	ZVV	w	89	0,1	2,16	351	0,9	33,33	435	h	
154	Kontrolle	w	78		0,57	56	2,3	0,00			
155	Kontrolle	m	53		0,03	46	3,1	0,00			
169	Kontrolle	w	53		0,1	32	10,5	0,00			
182	Kontrolle	m	64		0,43	79		28,79			
194	VAV	m	63	0,33	3,4	158		130,3		h	





Legende zu der Tabelle:

Geschlecht: w = weiblich; m= männlich

Foto: h = hämorrhagisch; nh = nicht hämorrhagisch

FAG: i = ischämisch; ni = nicht ischämisch; n.a. = nicht auswertbar

Nummer	Erkrankung
4	Glaskörperfloater
16	Glaskörperfloater
39	Makulaforamen
109	Epiretinale Gliose
118	Makulaforamen
131	Epiretinale Gliose
134	Makulaforamen
154	Epiretinale Gliose
155	Glaskörperfloater
169	Glaskörperfloater
182	Makulaforamen

**Tabelle 4.13: Erkrankungen der Kontrollgruppe**

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Vorklinische Ausbildung (alle Philipps-Universität Marburg)

Herr Prof. Dr. H.-D. Basler (Medizinische Psychologie)

Herr Prof. Dr. Y. Cetin (Anatomie und Zellbiologie)

Herr Prof. Dr. Dr. J. Daut (Physiologie und Pathophysiologie)

Frau Dr. B. Feuser (Physik)

Herr Prof. Dr. J. Koolmann (Physiologische Chemie)

Herr Prof. Dr. R. Lill (Zytobiologie und Zytopathologie)

Herr Prof. Dr. Dr. U. Mueller (Medizinische Soziologie und Sozialmedizin)

Herr Prof. Dr. B. Neumueller (Chemie)

Herr Prof. Dr. D. Oliver (Physiologie und Pathophysiologie)

Herr Prof. Dr. Dipl.-Psych. M. Pfingsten (Medizinische Psychologie)

Frau PD Dr. R. Preisig-Müller (Physiologie und Pathophysiologie)

Frau Prof. Dr. A. del Rey (Physiologie und Pathophysiologie)

Frau Prof. Dr. I. Sahmland (Geschichte der Medizin)

Herr PD Dr. B. Schütz (Anatomie und Zellbiologie)

Herr Prof. Dr. J. Seitz (Anatomie und Zellbiologie)

Herr Prof. Dr. E. Weihe (Anatomie und Zellbiologie)

Herr PD Dr. R. Westermann (Anatomie und Zellbiologie)

Klinische Ausbildung (alle Philipps-Universität Marburg)

Herr Prof. Dr. P. Barth (Pathologie)

Herr Prof. Dr. D. Bartsch (Viszeral- und Thoraxchirurgie)

Frau Prof. Dr. E. Baum (Allgemeinmedizin, Präventive- und Rehabilitative Medizin)

Frau Prof. Dr. K. Becker (Kinder- und Jugendpsychiatrie, -psychosomatik und -psychotherapie)

Herr Prof. Dr. S. Becker (Virologie)

Herr Prof. Dr. S. Bien (Neuroradiologie)

Herr Prof. Dr. F. Czbayko (Pharmakologie und Toxikologie)

Frau Prof. Dr. R. Engenhardt-Cabillic (Strahlentherapie)

Frau Prof. Dr. S. Fuchs-Winkelmann (Orthopädie und Rheumatologie)

Herr Prof. Dr. T. Gress (Gastroenterologie und Endokrinologie)

Herr Prof. Dr. K.-H. Grzeschik (Humangenetik)

Herr Prof. Dr. R. Grosse (Pharmakologie und Toxikologie)

Herr Prof. Dr. M. Hertl (Dermatologie und Allergologie)

Herr Prof. Dr. R. Hofmann (Urologie und Kinderurologie)

Herr Dr. F. Holst (Tropenmedizin)

Herr Prof. Dr. J. Hoyer (Nephrologie)

Herr Prof. Dr. Dr. P. H. Kann (Endokrinologie und Diabetologie)

Herr Prof. Dr. T. Kircher (Psychiatrie und Psychotherapie)

Herr Prof. Dr. M. Lohoff (Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene)

Herr Prof. Dr. M. Luster (Nuklearmedizin)

Herr Prof. Dr. R. Maier (Kinder- und Jugendmedizin)

Herr Prof. Dr. B. Maisch (Kardiologie)

Frau Prof. Dr. A. Maisner (Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene)

Herr Prof. Dr. S. Mennel (Augenheilkunde)

Herr Prof. Dr. R. Moll (Pathologie)

Herr Prof. Dr. R. Moosdorf (Herz- und thorakale Gefäßchirurgie)

Herr Prof. Dr. R. Mutters (Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene)

Herr Prof. Dr. A. Neubauer (Hämatologie, Onkologie und Immunologie)

Herr Prof. Dr. C. Nimsky (Neurochirurgie)

Herr Prof. Dr. Dr. W. Oertel (Neurologie)

Herr Prof. Dr. A. Pagenstecher (Neuropathologie)

Herr Prof. Dr. T. Plant (Pharmakologie und Toxikologie)

Herr Prof. Dr. H. Renz (Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie, molekulare Diagnostik)

Herr Prof. Dr. G. Richter (Medizinethik)

Herr Prof. Dr. S. Ruchholtz (Unfall-, Hand-, und Wiederherstellungschirurgie)

Herr Prof. Dr. H. Schäfer (Medizinische Biometrie und Epidemiologie)

Herr Prof. Dr. S. Schmidt (Geburtshilfe und Perinatalmedizin)

Herr Prof. Dr. J. Schneider (Arbeitsmedizin)

Herr Prof. Dr. W. Sekundo (Augenheilkunde)

Herr Prof. Dr. C. Vogelmeier (Pneumologie)

Herr Prof. Dr. U. Wagner (Gynäkologie, gynäkologische Endokrinologie und Onkologie)

Herr Prof. Dr. J. Werner (Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde)

Herr Prof. Dr. H. Wulf (Anästhesie und Intensivmedizin)

Praktisches Jahr (alle Christliches Krankenhaus Quakenbrück)

Herr Dr. H. Druckmiller (Pneumologie)

Frau Dr. B. Götting (Kardiologie und Angiologie)

Herr Dr. M. Grade (Gastroenterologie und allgemeine Innere Medizin)

Herr Drs. B. Hogt (Unfallchirurgie und Orthopädie)

Herr Dr. M. Hotz (Neurologie)

Herr Prof. Dr. St. Matthaei (Endokrinologie und Diabetologie)

Herr Dr. C. Reuter (Allgemein- und Viszeralchirurgie)

## **Danksagung**

Ohne die Unterstützung und Förderung von und durch Herrn Professor Dr. Stefan Mennel, Herrn PD Dr. Thomas Bertelmann und Herrn Professor Dr. Walter Sekundo wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Alle Verantwortlichen des Institutes haben mich als Doktorand hervorragend betreut.

Großer Dank geht an alle Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Klinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, für die zuverlässige und hilfreiche Unterstützung meiner Promotion.

Besonderer Dank gilt den Ärzten der Klinik, die durch ihre Unterstützung und Durchführung der Probenentnahme diese Studie erst ermöglichten. Namentlich danke ich besonders Frau Dr. Reka Bölöni, Herrn Dr. Konstantinos Droutsas, Herrn PD Dr. Stephan Schulze und Frau Dr. Nadja Viktoria Weber.

Mit meinen ehemaligen Kommilitoninnen und jetzigen Kolleginnen Frau Dr. Marta Spychalska, Frau Laura Kohlberger, Frau Christine Heun und Frau Gina Lang habe ich ein wundervolles und produktives Doktorandenteam gefunden. Vielen Dank für die schöne Zeit.

Ein Teil der Studie, die in dieser Dissertation beschrieben wurde, konnte nur durch die gute Zusammenarbeit mit der Augenklinik der Goethe-Universität Frankfurt, der Abteilung für Labormedizin und Pathobiochemie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg, und dem Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Marburg, entstehen. Hier danke ich vor allem den verantwortlichen Ärzten Herrn Professor Dr. Frank Koch, Herrn PD Dr. Michael Koss, Herrn Professor Dr. Ulrich Sachs und Herrn PD Dr. Thomas Stief.

Abschließend danke ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Julia, für die stetige Motivation und Geduld.